



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
2009

**Márcia Raquel Maia  
Saraiva**

**Enzimas extracelulares de fungos da família  
*Botryosphaeriaceae***



**Márcia Raquel Maia  
Saraiva**

**Enzimas extracelulares de fungos da família  
*Botryosphaeriaceae***

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Prof. Doutora Ana Cristina Sarmiento, Professora Auxiliar Convidada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e co-orientação científica do Doutor Artur Alves, Investigador auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro

Dedico a Deus.....

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutora Maria Ângela Sousa Dias Alves Cunha**

professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

**Prof. Doutora Sandra Isabel Moreira Pinto Vieira**

professora auxiliar convidada da Secção Autónoma de Ciências da Saúde, Universidade de Aveiro.

**Doutor Artur Alves**

investigador auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar da Universidade de Aveiro.

**Prof. Doutora Ana Cristina Sarmento**

professora auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

## **agradecimentos**

Ao Prof. Doutor António Correia, por me ter contagiado com a sua paixão por este mundo, tão vasto e interessante, que é a Microbiologia!! Por me ter transmitido o conhecimento suficiente para evoluir e ultrapassar as barreiras, pelo seu apoio e orientação, Obrigada!

À minha “chefinha” Doutora Cristina, pela sua incondicional persistência com o trabalho e comigo! Por todo o ensinamento que me proporcionou. Obrigada por tudo!

Ao Doutor Artur, por todo o conhecimento que me transmitiu. Obrigada!

À maravilhosa equipa do laboratório, Maria João, Alexandra, Cláudia, Daniela, Artur, Sofia, Anabela, Juliana, que me acolheram extraordinariamente bem, desde o início, tendo sempre uma palavra amiga. Obrigada pela sempre e boa disposição e optimismo, sem a vossa excelente ajuda teria sido bem mais difícil... Obrigada a todos!

Às minhas companheiras de mestrado, Isabel e Eliana, pelos momentos que partilhámos.

A todos os meus amigos (Sofia, Sónia, Carla e Bruno) que tanto me apoiaram.

À Isabel Ramos e Juliana, por terem sido a minha “muleta” durante estes dois anos, nos bons e maus momentos,... é sem dúvida uma amizade para a vida, Obrigada a ambas!

À minha mãe, Isabel, por todo o apoio que me tem dado nestes anos, apesar de a vida ser dura e nem sempre justa. Muito obrigada Mãe!!

Ao Pedro, por acreditar sempre em mim e nas minhas capacidades, pelo seu imenso amor e apoio... não há palavras para descrever o que és para mim...LY

## palavras-chave

Biotecnologia, Enzimas extracelulares, Fungos, *Botryosphaeriaceae*, Mecanismo de infecção

## resumo

Num mundo cada vez mais industrializado, surge a necessidade de procurar novos meios de produção de enzimas, devido às suas inúmeras aplicabilidades.

Com a revolução biotecnológica surgem novos e otimizados métodos de produção de enzimas, utilizando “novos” microrganismos ou microrganismos já conhecidos mas geneticamente modificados com o intuito de aumentar a produção enzimática.

A família *Botryosphaeriaceae* é constituída por espécies amplamente distribuídas no Mundo. São espécies fitopatogénicas que colonizam uma enorme variedade de espécies vegetais, havendo inclusive casos de isolados obtidos em Humanos.

Este trabalho teve como objectivos principais a detecção e quantificação de enzimas extracelulares, produzidas por fungos filamentosos da família *Botryosphaeriaceae*.

Foram estudados 53 isolados de fungos pertencentes à família *Botryosphaeriaceae* de cinco géneros distintos (*Neofusicoccum*, *Lasiodiplodia*, *Diplodia*, *Dothiorella* e *Botryosphaeria*). Todos os isolados mostraram ser produtores das enzimas extracelulares pesquisadas: proteases, celulasas, lipases, lacases, pectinases, ureases, amilases e xilanases.

Posteriormente, procedeu-se à quantificação das actividades proteolítica, celulolítica e lenhinolítica a 37, 50 e 70°C. Os resultados mostraram que o género *Neofusicoccum* apresenta isolados cujos extractos enzimáticos extracelulares possuem actividade mais elevada bem como uma maior estabilidade térmica e, deste modo, potencialmente mais atractivos a nível biotecnológico.

## keywords

Biotechnology, Extracellular enzymes, Fungi, *Botryosphaeriaceae*, Infection mechanism

## abstract

In a world increasingly industrialized, it is necessary to seek new means of production of enzymes, due to its numerous applicabilities.

With the biotechnological revolution, new and optimized methods of production of enzymes appear, using novel microorganisms or microorganisms already known but genetically modified in order to increase the enzyme production.

The family *Botryosphaeriaceae* comprises species that are worldwide distributed and that colonize a variety of plant species. Furthermore, there have been already cases of isolates obtained in Humans.

This work had as main objectives the detection and quantification of extracellular enzymes, produced by filamentous fungi of the *Botryosphaeriaceae* family.

Fifty three isolates of fungi belonging to the family *Botryosphaeriaceae* of five different genera (*Neofusicoccum*, *Lasiodiplodia*, *Diplodia*, *Dothiorella* and *Botryosphaeria*) were studied. All isolates showed to be able to produce extracellular enzymatic activity such as: proteases, cellulases, lipases, laccases, amylases, pectinases and xylanases.

Additionally, extracellular activities of proteases, cellulases and lacases were quantified at 37, 50 and 70°C. Results showed that the genus *Neofusicoccum* presents isolates whose extracellular extracts exhibit higher enzymatic activity as well as a higher thermal stability. Therefore, these are potentially the most attractive for biotechnology purposes.

*“Não acredites nas coisas só porque alguém te diz, ou porque está simplesmente escrito num livro ou porque te foram transmitidas através das tradições. Mas se perceberes que uma coisa é boa e útil para ti e para os outros, é nessa altura que podes aceitá-la e acreditar nela.”*

BUDA



## Índice

Índice de figuras .....	XI
Lista de abreviaturas .....	XIV
CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	1
1– BIOTECNOLOGIA E ENZIMAS .....	3
1.1.1- <i>Amilases</i> .....	4
1.1.2- <i>Celulases</i> .....	5
1.1.3- <i>Lacases</i> .....	7
1.1.4- <i>Lipases</i> .....	9
1.1.5 <i>Pectinases</i> .....	11
1.1.6 <i>Proteases</i> .....	12
1.1.7 <i>Ureases</i> .....	14
1.1.8 <i>Xilanases</i> .....	15
1.2 - FUNGOS .....	16
1.2.1- FUNGOS FILAMENTOSOS .....	16
1.2.1.1- <i>Fungos fitopatogénicos</i> .....	17
I. Família <i>Botryosphaeriaceae</i> .....	17
a) – Género <i>Botryosphaeria</i> .....	18
b) – Género <i>Neofusicoccum</i> .....	19
c) – Género <i>Dothiorella</i> .....	19
d) – Género <i>Diplodia</i> .....	20
e) – Género <i>Lasiodiplodia</i> .....	20
OBJECTIVOS .....	23
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	27
2.1 – ESPÉCIES UTILIZADAS .....	29
2.2 – MEIOS DE CULTURA .....	31
2.2.1 – <i>Meios para crescimento de fungos</i> .....	31

2.2.2 – Meios sólidos para detecção e determinação da actividade enzimática extracelular .....	31
2.3 – DETECÇÃO DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EXTRACELULARES .....	34
2.4 – QUANTIFICAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA .....	37
2.4.1 – Espectrofotometria .....	37
2.4.1.1 – Proteases .....	37
2.4.1.2– Lacases .....	38
2.4.1.3– Celulases.....	38
2.4.2 – Método titrimétrico .....	40
2.4.2.1 Lipases.....	40
2.5– ZIMOGRFIA.....	42
2.6– QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	43
2.7– PURIFICAÇÃO DE ENZIMAS POR CROMATOGRFIA.....	43
2.7.1 – Cromatografia por exclusão molecular .....	44
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	47
3.1 – DETECÇÃO DE ENZIMAS EXTRACELULARES .....	49
3.2 – QUANTIFICAÇÃO DE ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EXTRACELULARES.....	56
3.2.1 Proteases .....	56
3.2.2 Celulases .....	60
3.2.3 Lipases.....	64
3.2.4 Lacases .....	69
3.3– CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA - PROTEASES.....	71
3.4- PURIFICAÇÃO PARCIAL DE ENZIMAS .....	73
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÕES .....	75
CAPÍTULO 5 – PERSPECTIVAS FUTURAS .....	79
CAPÍTULO 6 – BIBLIOGRFIA.....	83
CAPITULO 7 - ANEXOS.....	99

## Índice de figuras

Fig. 1: Representação da estrutura cristalográfica de uma amilase fúngica .....	5
Fig. 2: Representação da estrutura cristalográfica de uma celulase .....	7
Fig. 3: Estrutura tridimensional de lacase de <i>Coprinus cinereus</i> .....	8
Fig. 4: Representação da estrutura cristalográfica de uma lipase de <i>G. candidum</i> .....	11
Fig. 5 : Representação da estrutura cristalográfica de uma pectinase de <i>A. niger</i> .....	12
Fig. 6: Representação da estrutura cristalográfica da subtilisina BPN de <i>Bacillus</i> .....	13
Fig. 7: Representação da estrutura cristalográfica de uma urease pertencente a <i>H.pylori</i> .....	14
Fig. 8: Representação da estrutura cristalográfica de uma xilanase de <i>A. nidulans</i> .....	15
Fig. 9: Fotografia de uma espécie de <i>Botryosphaeria</i> em meio OMA.....	18
Fig. 10: Dano causado no pinheiro por <i>Diplodia sp.</i> .....	20
Fig. 11: Fotografia de uma estirpe inoculada em meio Xilanase .....	49
Fig. 12: Fotografia de uma estirpe em placa de meio Pectinase.....	49
Fig. 13: Fotografia de uma estirpe inoculada em meio Celulase.....	49
Fig. 14: Fotografia de um isolado produtor de lipase, inoculado em meio lipase.....	50
Fig. 15: Fotografia de um isolado inoculado em meio amilase.....	50
Fig. 16: Fotografia de um isolado inoculado em meio SM .....	50
Fig. 17: Fotografia de um isolado inoculado em meio Urease .....	51
Fig. 18: Fotografia de um isolado inoculado em meio TAM .....	51
Fig. 19: Estrutura química do ácido tânico.....	51
Fig. 20: Gráfico da actividade proteolítica extracelular dos isolados pertencentes ao género <i>Neofusicoccum</i> .....	56
Fig. 21: Actividade proteolítica dos isolados pertencentes ao género <i>Dothiorella</i> .....	57
Fig. 22: Actividade proteolítica dos isolados pertencentes ao género <i>Diplodia</i> .....	58
Fig. 23: Gráfico relativo à actividade proteolítica das estirpes pertencentes ao género <i>Botryosphaeria</i> .....	58
Fig. 24: Gráfico relativo à actividade proteolítica das estirpes pertencentes ao género <i>Lasiodiplodia</i> .....	59

Fig. 25: Actividade celulolítica de isolados pertencentes ao género <i>Neofusicoccum</i> . A- atividade total; B- atividade exoglucanase .....	60
Fig. 26: Actividade celulolítica de isolados pertencentes ao género <i>Dothiorella</i> . A- atividade total; B- atividade exoglucanase.....	61
Fig. 27: Actividade celulolítica dos isolados pertencentes ao género <i>Diplodia</i> . A- atividade total; B- atividade exoglucanase.....	62
Fig. 28: Actividade celulolítica de isolados pertencentes ao género <i>Botryosphaeria</i> . A- atividade total; B- atividade exoglucanase .....	62
Fig. 29: Actividade celulolítica de isolados pertencentes ao género <i>Lasiodiplodia</i> . A- atividade total; B- atividade exoglucanase .....	63
Fig. 30: Actividade lipolítica das estirpes pertencentes ao género <i>Neofusicoccum</i> . ....	65
Fig. 31: Actividade lipolítica das estirpes pertencentes ao género <i>Dothiorella</i> . ....	65
Fig. 32: Actividade lipolítica das estirpes pertencentes ao género <i>Diplodia</i> . ....	66
Fig. 33: Actividade lipolítica das estirpes pertencentes ao género <i>Botryosphaeria</i> .....	66
Fig. 34: Actividade lipolítica das estirpes pertencentes ao género <i>Lasiodiplodia</i> . ....	67
Fig. 35: Actividade linholítica de isolados pertencentes ao género <i>Dothiorella</i> , utilizando como substrato o DMP.....	69
Fig. 36: Actividade linholítica de isolados pertencentes ao género <i>Neofusicoccum</i> , utilizando como substrato o DMP.....	69
Fig. 37: Actividade linholítica de isolados pertencentes ao género <i>Diplodia</i> , utilizando como substrato o DMP .....	70
Fig. 38: Actividade linholítica de isolados pertencentes ao género <i>Botryosphaeria</i> , utilizando como substrato o DMP.....	70
Fig. 39: Actividade linholítica de isolados pertencentes ao género <i>Lasiodiplodia</i> , utilizando como substrato o DMP.....	70
Fig. 40: Zimografia em gel de poliacrilamida com gelatina, com isolados da família <i>Botryosphaeriaceae</i> .....	72
Fig. 41: Zimografia em gel de poliacrilamida com gelatina realizado com os picos assinalados no cromatograma.....	74

## ***Índice de tabelas***

<b>Tabela 1:</b> Listagem de isolados utilizados neste trabalho.....	28
<b>Tabela 2:</b> Presença ou ausência das várias enzimas extracelulares, nos isolados do género <i>Neofusicoccum</i> em estudo. ....	49
<b>Tabela 3:</b> Presença ou ausência das várias enzimas extracelulares, nos isolados do género <i>Dothiorella</i> em estudo. ....	49
<b>Tabela 4:</b> Presença ou ausência das várias enzimas extracelulares, nos isolados do género <i>Diplodia</i> em estudo. ....	50
<b>Tabela 5:</b> Presença ou ausência das várias enzimas extracelulares, nos isolados do género <i>Botryosphaeria</i> em estudo. ....	51
<b>Tabela 6:</b> Presença ou ausência das várias enzimas extracelulares, nos isolados do género <i>Lasiodyplodia</i> em estudo.....	51

### ***Lista de abreviaturas***

Abs – Absorvância

CMC – Carboximetil celulose

CTAB - Brometo de cetil-trimetilamónia

DMP – 2,6-dimetoxifenol

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNS – Ácido dinitrossalicílico

Lip – Lipase

o.d – Densidade óptica

OMA – “Oatmeal agar “ – agar de aveia

PDA – “Potato dextrose agar” – agar de dextrose de batata

PF – Papel de filtro

RPM – Rotações por minuto

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SM – “Skim milk” – leite semi-desnatado

T – temperatura

t - tempo

TAM – Meio de ácido tânico

V – Volt

## *Capítulo 1 – Revisão Bibliográfica*

## **1– Biotecnologia e Enzimas**

A biotecnologia tem como base a união da biologia à tecnologia, sendo um conjunto de técnicas que utiliza os seres vivos no desenvolvimento de processos e produtos. A biotecnologia envolve várias áreas do conhecimento e, em consequência, vários profissionais, sendo uma ciência de natureza multidisciplinar (Lima & Mota, 2005).

Apesar do termo “biotecnologia” ser relativamente novo, o princípio é muito antigo, sendo utilizado pelos nossos antepassados, embora sem a noção clara de que o praticavam. Por exemplo, a utilização de leveduras na fermentação do mosto e farinhas, para produção de vinho e pão vem de muitos anos antes de Cristo. Com a evolução da ciência, inúmeras metodologias biotecnológicas têm sido optimizadas, aumentando os benefícios económicos, sociais e ambientais (Lima & Mota, 2005).

Vários cientistas, com os seus trabalhos, desempenharam um papel importante na evolução e sistematização da biotecnologia: Louis Pasteur com a descoberta dos microrganismos em 1861, Gregor Mendel com a descoberta da hereditariedade em 1865, James Watson e Francis Crick com a descoberta da estrutura do DNA em 1953, entre outros (Lima & Mota, 2005).

As várias técnicas relacionadas com a biotecnologia têm trazido, em geral, benefícios para a sociedade. As fermentações industriais na produção de vinhos, cervejas, pães, queijos e vinagres (Messina, 2000); a produção de fármacos, vacinas, antibióticos e vitaminas (Melo, 2007); a utilização de biofungicidas no controlo biológico de pragas e doenças (Lima & Mota, 2005); o uso de microrganismos visando a biorremediação (Dua *et al.*, 2002); o uso de bactérias fixadoras de azoto e fungos simbioses para aumentar a produtividade das plantas (Demain, 2006); o desenvolvimento de plantas e animais melhorados utilizando tanto técnicas convencionais de melhoramento genético como também técnicas moleculares – organismos transgénicos (Glazer & Nikaido, 2007).

Para que a vida seja possível, é necessário que as reacções químicas que a sustentam se dêem a uma determinada velocidade. As reacções bioquímicas não se realizariam a uma velocidade relativamente elevada se não fossem catalisadas (Aehle, 2007).



A produção de exoenzimas é comum em muitas espécies de fungos filamentosos como resposta a determinados estímulos ambientais (Colen, 2006). Os fungos segregam uma variedade de enzimas extracelulares tais como amilases, celulasas, proteases, lipases, xilanases, pectinases, lacases, entre outras (Maheshwari *et al.*, 2000). A síntese destas enzimas está sujeita a vários mecanismos regulatórios de inibição e indução, sendo a secreção direccionada por péptidos sinal, que fazem parte da proteína a ser exportada, e que, ao serem reconhecidos pela célula, permitem a passagem pelos poros da membrana celular (Gallo, 2006).

As enzimas apresentam ampla utilização biotecnológica, estendendo a sua aplicação por ramos tão diversos como a medicina ou a farmacologia e em diversas áreas industriais como alimentar, têxtil, limpeza, entre outros (Lima & Mota, 2005).

### **1.1.1- Amilases**

As amilases são hidrolases e constituem um grupo de enzimas que possuem acção sobre o amido e amilose libertando diversos produtos, incluindo dextrinas e progressivamente pequenos polímeros compostos de unidades de glicose (Gupta *et al.*, 2003).

O amido é encontrado principalmente em sementes de cereais como milho, cevada, trigo e arroz e em tubérculos ou raízes como batata e mandioca cujo tamanho e forma dos grãos são específicos para os diferentes cereais (Moraes, 2004). O amido é o mais importante polissacarídeo de reserva do reino vegetal, é constituído por amilose (25%) e amilopectina (75%). A amilose é um polímero linear constituído por cerca de 6000 resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas do tipo  $\alpha$ -1,4. A amilopectina consiste em pequenas cadeias laterais de 15 a 45 resíduos unidos por ligações do tipo  $\alpha$ -1,6 (Buléon *et al.*, 1998).

Segundo Gupta (2003), as amilases podem ser divididas em dois grupos, consoante o tipo de ligação que hidrolisam, as endoamilases e exoamilases. As endoamilases hidrolisam a molécula do amido aleatoriamente. Essa acção causa a formação de ramos lineares de oligossacarídeos de cadeias de vários comprimentos e dessa forma quebram as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 presentes na parte interna das cadeias de amilose ou amilopectina. A  $\alpha$ -amilase (E.C. 3.2.1.1) é a endoamilase mais conhecida.

As exoamilases hidrolisam exclusivamente ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 produzindo glicose, maltose ou dextrinas (Norouzian *et al.*, 2006). No entanto, existem exoamilases, como é o caso da glucoamilase, que degradam o substrato produzindo apenas glicose.

As amilases são de grande importância biotecnológica pois apresentam aplicações nas indústrias têxteis, papel e celulose, de couro, detergentes, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefacção e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (Pandey *et al.*, 2000; Gupta *et al.*, 2003). Apesar de serem obtidas a partir de diversas fontes, incluindo plantas, animais e microrganismos, são as enzimas microbianas que geralmente encontram maior procura industrial. Actualmente, grandes quantidades de amilases microbianas estão disponíveis comercialmente e têm aplicação quase completa na hidrólise do amido em indústrias de processamento do amido (Gupta *et al.*, 2003).



**Fig. 1:** Representação da estrutura cristalográfica de uma amilase fúngica (referência do *Protein Data Bank*: 2GUY).

### 1.1.2- Celulases

As celulases são um grupo de enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases. Na natureza, a degradação da celulose é levada a cabo por fungos e bactérias. Estes produzem celulases, que degradam a cadeia polimérica, originando polímeros mais curtos (Kim *et al.*, 2009).

As espécies de fungos produtores de celulases mais estudados são *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum* e *Humicola insolens*. Entre as bactérias, *Cellulomonas fimi* e *Clostridium thermocellum* são as mais estudadas (Wood, 1992).

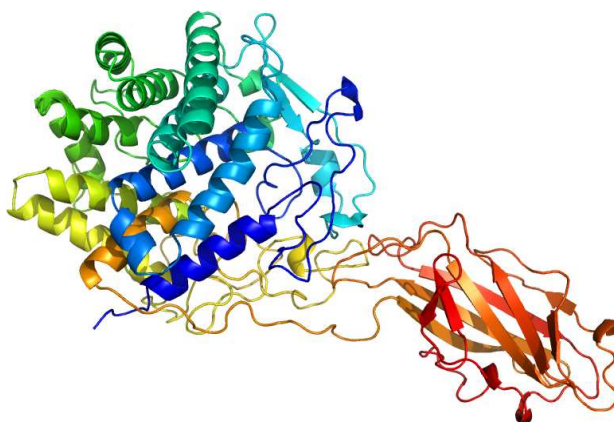
A celulose é um polímero constituído por unidades moleculares de  $\beta$ -D-glicose, ligadas entre si por ligações glicosídicas 1,4  $\beta$ -D. Da hidrólise da celulose obtêm-se polímeros mais pequenos, oligossacarídeos com terminais redutores e não redutores que, após hidrólises mais extensas, se decompõem dando origem a celobiose (dissacarídeo) e a glicose (Kim *et al.*, 2009).

Os sistemas celulolíticos dos fungos e de algumas bactérias, segundo Wood (1992), são constituídos por enzimas que actuam nas extremidades (exoglucanases) ou que actuam no interior (endoglucanases) das cadeias de celulose.

No entanto, dada a especificidade das diferentes celulases e o seu modo de acção, é geralmente reconhecida a existência de três tipos de celulases nos sistemas eucariontes: exoglucanases ou celobiohidrolases, endoglucanases e  $\beta$ -glucosidase ou celobiase. As endoglucanases hidrolisam maioritariamente as ligações internas no polímero da celulose, produzindo novas cadeias terminais (Heikinheimo, 2002).

As exoglucanases iniciam a hidrólise nas extremidades da cadeia, e não produzem uma quantidade significativa de novas cadeias terminais na superfície da celulose (Heikinheimo, 2002; Irwin *et al.*, 1993). Estas também podem actuar nas regiões cristalinas da celulose sem a ajuda das endoglucanases (Chanzy e Henrissat, 1985; Heikinheimo, 2002). As  $\beta$ -glucosidases completam a hidrólise catalisando a hidrólise da celobiose a glucose.

A hidrólise da celulose cristalina pelas celulases requer a acção sinérgica de endoglucanases e das exoglucanases. O máximo sinergismo é obtido com uma elevada quantidade de exoglucanases na mistura (Nidetzky *et al.*, 1993).



**Fig. 2:** Representação da estrutura cristalográfica de uma celulase, produzida por *Thermobifida fusca* (referência do *Protein Data Bank*: 1JS4).

### 1.1.3- Lacases

Até recentemente a presença de lacases era associada somente a Eucariontes (nomeadamente fungos, plantas superiores e insectos), mas atualmente existem evidências da sua distribuição em Procariontes (Claus, 2004).

As lacases pertencem ao grupo das enzimas polifenol-oxidases. Em plantas, estão envolvidas na lenhificação. Em fungos, além da degradação de lenhina, as lacases parecem estar envolvidas na esporulação, produção de pigmentos e na patogenicidade sobre plantas. Em insectos, as lacases catalisam a união oxidativa de catecóis com proteínas envolvidas na esclerotização da cutícula (Yaver *et al.* 1996, Enguita *et al.*, 2003; Claus, 2004).

Devido à capacidade de catalisar a oxidação de fenóis e outros compostos aromáticos, as lacases fúngicas estão a cativar os investigadores em várias aplicações industriais como: deslenhificação (Claus, 2004), produção de etanol, modificação de fibras da madeira (Durán *et al.*, 2002), clareamento de corantes, síntese de produtos químicos/medicinais e remediação de solos e águas contaminadas (Mayer & Staples, 2002). Intensas pesquisas têm permitido elucidar a diversidade e funções das lacases (Schneider *et al.*, 1999, Durán *et al.*, 2002). Filogeneticamente, as lacases são membros da família de proteínas multi-cobres, que incluem a ascorbato oxidase, ceruloplasmina e bilirrubina oxidases (Klonowska *et al.*, 2002). As lacases geralmente são codificadas por uma família de genes. A expressão destes genes pode

ser constitutiva ou indutiva. Consequentemente, em diferentes fungos, a produção destas enzimas pode ser acentuada sob condições de cultura apropriadas (Klonowska *et al.*, 2002; Mayer & Staples, 2002; Claus, 2004). Assim, a produção de lacases é afectada por muitos factores durante o desenvolvimento fúngico, como a composição do meio de cultura, pH, temperatura, taxa de oxigenação, entre outros (Kahraman & Gurdal, 2002).

Normalmente a enzima é sintetizada no citoplasma, mas muitos exemplos de secreção têm sido descritos na bibliografia, embora pouca atenção tenha sido dada à localização sub-celular e ao seu mecanismo de secreção (Mayer & Staples, 2002).

As lacases são proteínas globulares e podem ter estruturas monoméricas, diméricas ou multiméricas, compreendendo subunidades de 45 a 80 kDa, dependendo da espécie e isoforma (Brown *et al.*, 2002).

Os fungos lenhícolíticos expressam frequentemente múltiplos genes de lacase, codificando isoenzimas com alta similaridade na estrutura primária, mas diferentes características físico-químicas (Brown *et al.*, 2002). Não existem dúvidas que as propriedades bioquímicas e físico-químicas da lacase (actividade, estabilidade, pH e temperatura óptimas, etc.) fornecem muitas informações iniciais importantes para estudos básicos e para a aplicação de lacases na biotecnologia (Mougin *et al.*, 2003; Shleev *et al.*, 2004). Algumas características de lacases como: massa molecular, pH óptimo de actividade e substrato específico são extremamente diversas, até dentro do mesmo género (Mayer & Staples, 2002).



**Fig. 3:** Representação da estrutura cristalográfica de uma lacase de *Coprinus cinereus* (referência do *Protein Data Bank*: 1HFU).

As lacases são enzimas excepcionalmente versáteis, catalisando reacções com diferentes substratos. São enzimas de ampla distribuição ocorrendo em todos os domínios dos seres vivos. Contudo, muitos estudos são necessários para melhor compreender a sua importância fisiológica e a sua utilização em processos biotecnológicos (Claus, 2004).

#### 1.1.4- Lipases

As lipases são enzimas com grande potencial de utilização tanto em pesquisas científicas, na produção de biodiesel, como em processos industriais, como na indústria do papel, devido a algumas características físico-químicas como a sua estabilidade, selectividade e especificidade (Jaeger *et al.*, 1994).

Apesar de as lipases poderem ser obtidas de animais, plantas e microrganismos, são estes últimos que produzem lipases em maior número e quantidade (Jaeger *et al.*, 1994).

Os fungos filamentosos são o grupo onde a produção de lipases se destaca, quer pela sua enorme variedade estrutural quer pelas suas características fisiológicas e bioquímicas. É também por estes motivos que, nos últimos anos, se tem requerido várias patentes de produção de lipases por diferentes estirpes de fungos (Olson *et al.*, 1994), já que estas apresentam maior estabilidade térmica sendo possível a produção de lipases à escala industrial.

A acção destas enzimas, além da importância para a fisiologia do organismo produtor, apresenta aspectos de aplicabilidade importantes. É bem conhecido o papel das lipases como factor de virulência em infecções de origem microbiana e a sua aplicação biotecnológica tem aumentado exponencialmente (Jaeger *et al.*, 1994).

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases, E.C. 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres formados por glicerol e ácidos gordos de cadeia longa. Apresentam a peculiaridade de serem activadas em presença de interfaces hidrofóbicas (Bastida *et al.*, 1998), além de mostrarem pouca actividade em soluções aquosas contendo substratos solúveis (Martinelle, Holmquist & Hult, 1995). Assim, as lipases verdadeiras hidrolisam, como se pode constatar na

eq.1, total ou parcialmente o triacilglicerol a diacilglicerol, monoacilglicerol e ácidos gordos livres, agindo especificamente na interface água/óleo (Carvalho *et al.*, 2003).

Por outro lado, as esterases (E.C. 3.1.1.1) actuam sobre outros lípidos e em ésteres solúveis em água (Carvalho *et al.*, 2003).

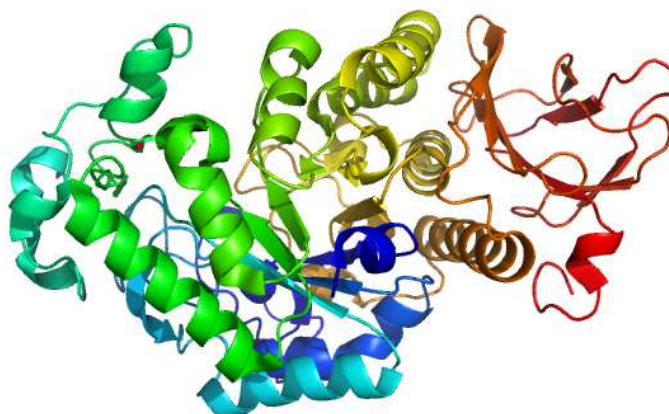
As lipases extracelulares são produzidas por microrganismos em condições favoráveis, sendo estudadas por quatro motivos: a) as lipases de bactérias patogénicas tais como *Corynebacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*, *Leptospira pomona* e *Mycoplasma spp.* estão implicadas na etiologia de doenças infecciosas; b) desempenham um papel importante na biorremediação de efluentes domésticos; c) as lipases produzidas por bactérias psicrófilas são contaminantes de alimentos; d) participam na degradação de produtos lácteos (Colen, 2006).

As lipases produzidas por fungos têm sido utilizadas na indústria de alimentos devido à sua diversa especificidade por substratos (Sharma *et al.*, 2001).

Os estudos sobre a aplicação de lipases têm aumentado significativamente nos últimos anos (Shieh *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004; Hamaa *et al.*, 2007). O campo mais importante de aplicação de lipases é a sua adição em detergentes. Outro campo de aplicação de crescente importância é o uso de lipases na indústria do papel, em que são utilizadas de modo a eliminar os componentes hidrófobos da madeira, que são responsáveis por problemas durante o fabrico do papel (Jaeger & Reetz, 1998). À medida que a demanda por combustíveis vai aumentando também é crescente o desenvolvimento de novos métodos para o uso de lipases na transesterificação de óleos e gorduras para a produção de biodiesel (Hamaa *et al.*, 2007).

São vários os factores que influenciam a síntese de lipases por microrganismos, sendo os principais: fonte de carbono, fonte de azoto, presença de indutores, presença de estimuladores e inibidores, pH do meio de cultura e inóculo (Dominguez *et al.*, 2003).

Quando o azeite é a única fonte de carbono, o microrganismo utiliza-o de modo sequencial. Inicialmente o azeite é hidrolisado por uma pequena quantidade de lipase em glicerol e ácidos gordos livres. Em seguida o microrganismo consome o glicerol libertado, ainda sem produção de lipase. Finalmente os ácidos gordos livres são consumidos com a produção de uma quantidade significativa de lipase (Montesinos *et al.*, 1996).



**Fig. 4:** Representação da estrutura cristalográfica de uma lipase de *Geotrichum candidum* (referência do *Protein Data Bank*: 1THG).

### 1.1.5 Pectinases

Existem dois tipos de liases, uma é a pectato liase (poligalacturonato liase, EC 4.2.2.2), a qual é específica para resíduos de ácido galacturônico, sendo a outra a pectina liase (polimetilgalacturonato liase, EC 4.2.2.10), específica para resíduos metil galacturonato (Hayashi *et al.*, 1997).

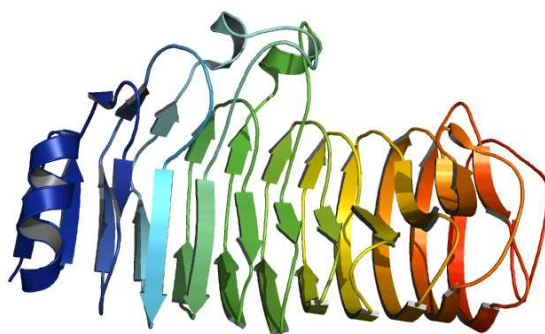
As pectinases formam um grupo de enzimas que degradam pectinas, hidrolisando ligações glicosídicas ao longo da cadeia de carbono. Podem ser despolimerizantes ou desesterificantes e são produzidas por plantas, fungos filamentosos, bactérias e leveduras (Gummadi, 2003). Algumas das aplicações destas enzimas na indústria alimentar incluem o amadurecimento de frutas, clarificação e redução de viscosidade em sumos de frutas, tratamento preliminar do sumo de uva para indústrias vinícolas, extracção de polpa de tomate, fermentação de chá e chocolate, tratamento de resíduos vegetais, remoção de gomas das fibras nas indústrias têxtil e de papel, nutrição animal, enriquecimento nutricional de alimentos infantis e extracção de óleos (Kashyap *et al.*, 2001; Uenojo & Pastore, 2007).

Durante as duas últimas décadas, o uso de celulasas, hemicelulasas e pectinases têm aumentado consideravelmente, especialmente nas indústrias alimentar, bebidas e vinhos, têxtil e de papel. Diversas companhias na Europa, Estados Unidos e no Japão produzem pectinases e



preparações comerciais de pectinases (Bhat, 2000; Gummadi, 2003). Actualmente, essas enzimas correspondem a cerca de 25% do mercado mundial de enzimas. O valor de vendas em 1995 foi de 1 bilhão de dólares americanos, dos quais 75 milhões somente com pectinases, aumentando exponencialmente para 2 bilhões de dólares em 2003 (Pandey, 2004).

As pectinases são utilizadas para reduzir o amargo excessivo em cascas de citrinos, restaurar o aroma perdido durante secagem e melhorar a consistência de pêssegos e pickles processados. A infusão de pectinase e  $\beta$ -glicosidase aumenta o aroma e as substâncias voláteis de frutas e vegetais, aumenta a quantidade de agentes antioxidantes em azeite virgem extra e reduz a indução ao ranço, além de outras aplicações (Uenojo & Pastore, 2007).



**Fig. 5:** Representação da estrutura cristalográfica de uma pectinase de *Aspergillus niger* (referência do Protein Data Bank: 1CZF).

### 1.1.6 Proteases

As proteases representam uma classe de enzimas com importantes papéis em processos fisiológicos e patológicos, as hidrolases. Além disto, elas possuem aplicação comercial, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais, sendo responsáveis por 60% das vendas internacionais de enzimas (Forgati e Kelly, 1990).

Estas enzimas estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos. Várias etapas proteolíticas importantes ocorrem no mecanismo invasivo de tumores, assim como no ciclo de infecção de um grande número de vírus e microrganismos patogênicos. Estes factos tornam as proteases um alvo quimioterapêutico valioso para o desenvolvimento de novos compostos farmacêuticos (Alvarez-sanchez *et al.*, 2000).

As enzimas proteolíticas também participam no catabolismo de proteínas, tanto nas vias degradativas como nas biossintéticas, e na libertação de hormonas activas a partir de proteínas precursoras (Alvarez-sanchez *et al.*, 2000). Certas modificações específicas e selectivas de proteínas durante a activação de enzimas ocorrem via proteólise, que também colabora no transporte de proteínas secretórias na membrana. As proteases têm também uma variedade de aplicações principalmente na indústria de detergentes e de alimentos (Rawling & Barret, 1994).

Tendo em vista os recentes acordos mundiais para o uso de tecnologias não poluentes, as proteases começaram a ser usadas em larga escala no tratamento do couro, substituindo os compostos tóxicos e poluentes até então usados (Alvarez-sanchez *et al.*, 2000). Na indústria farmacêutica, as proteases são usadas em pomadas cicatrizantes e têm um uso potencial noutros medicamentos. As proteases hidrolisam as proteínas em péptidos e aminoácidos, facilitando a sua absorção pelas células; devido ao seu papel despolimerizante, as enzimas extracelulares têm um papel importante na nutrição (Rawling & Barret, 1994a).

As proteases são encontradas em vários microrganismos, como vírus, bactérias, protozoários, leveduras e fungos. A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas têm levado a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana. Os microrganismos representam uma excelente fonte de proteases devido à sua grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética (Rao *et al.*, 1998).



**Fig. 6:** Representação da estrutura cristalográfica da subtilisina BPN de *Bacillus amyloliquefaciens* (referência do *Protein Data Bank*: 1YJB).

### 1.1.7 Ureases

As ureases podem ser encontradas em algas, plantas, leveduras e fungos filamentosos (Lubbers *et al.*, 1996).

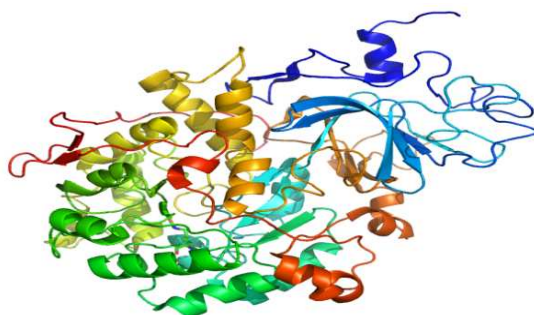
A presença de ureases em várias bactérias patogénicas como *Helicobacter pylori* e *Proteus mirabilis*, está fortemente correlacionada com a patogenicidade em humanos. Também os fungos de relevância médica possuem actividade ureásica (Cox *et al.*, 2000).

As ureases são enzimas dependentes de níquel que catalisam a hidrólise da ureia em amónia e carbamatos, intermediários que são posteriormente convertidos numa segunda molécula de amónia e dióxido de carbono (Lubbers *et al.*, 1996), pertencendo assim ao grupo das hidrolases.

As ureases têm inúmeras aplicações industriais tais como *kits* de diagnóstico para medição da ureia e *kits* para detecção de alcoolémica (Fujinawa & Dela, 1990).

Existem muitas fontes de urease, incluindo bactérias como *Lactobacillus ruminis*, *Corynebacterium lillium*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus reuteri* e fungos como o *Aspergillus níger* ou *Rhizopus oryzae*, como faz referência o trabalho de Mackay & Pateman (1980).

Os fungos filamentosos representam cerca de 40% dos produtores de enzimas como amilases, lactases, pectinases, entre outras. Industrialmente também é preferível o uso de fungos filamentosos, especialmente *Aspergillus* spp. uma vez que as indústrias de fermentação já estão familiarizadas com as condições necessárias para a produção optimizada das mesmas (Archer & Peberdy, 1997).



**Fig. 7:** Representação da estrutura cristalográfica de uma urease pertencente a *Helicobacter pylori* (referência do *Protein Data Bank*: 1E9Z).

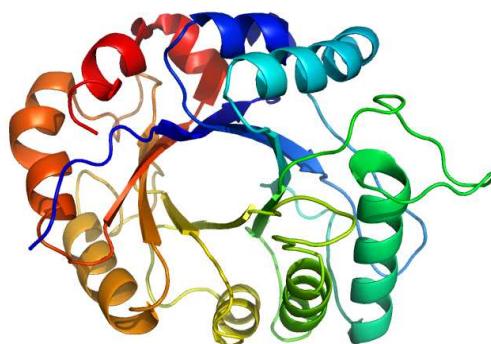
### 1.1.8 Xilanases

As xilanases são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases, produzidas principalmente por fungos e bactérias, estas enzimas degradam  $\beta$ -1,4-xilano em xiloses. Os xilanos são os polissacarídeos mais abundantes depois da celulose (Subramaniyan *et al.*, 2001).

A produção de xilanases merece um especial destaque nas indústrias de papel e celulose, diminuindo a utilização de produtos organoclorados na etapa do branqueamento da polpa Kraft, podendo também serem utilizadas na reciclagem do papel (Conte *et al.*, 2003). Estas enzimas podem ser obtidas por processos biotecnológicos, por cultivo submerso ou em meio sólido, sendo que este último apresenta algumas vantagens, como a utilização de resíduos agro-industriais como substrato, facilidade de recuperação do produto obtido, entre outros (Subramaniyan *et al.*, 2001).

Também têm sido usadas para hidrolisar os polissacarídeos não amiláceos, aumentando a digestibilidade de alimentos como a cevada, o trigo, o centeio, a aveia e o tritcale (Conte *et al.*, 2003).

Estas enzimas, em associação com as celulases, podem ser utilizadas para remover as paredes das células vegetais e desta forma aprimorar o processo de extracção de óleos vegetais. Podem também ser utilizadas na produção de sumos de fruta, no fabrico de café solúvel, na libertação do conteúdo celular para produção de várias substâncias e na produção de protoplastos para uso na engenharia genética (Wong e Saddler, 1992).



**Fig. 8:** Representação da estrutura cristalográfica de uma xilanase pertencente a *Aspergillus nidulans* (referência do *Protein Data Bank*: 1TE1).

## **1.2 - Fungos**

Actualmente encontram-se já descritas mais de 100.000 espécies de fungos, mas estima-se que existam até cerca de 1,5 milhões de espécies, sendo que a maioria ainda está por ser identificada e descrita pelos micologistas (Buckley, 2008). Assim, acredita-se que muitas espécies existentes hoje se extinguirão antes dos micologistas terem conhecimento das mesmas.

Embora o estudo dos fungos tenha vindo a aumentar exponencialmente nos últimos 100 anos, verifica-se, no entanto, que continuam a ser ignorados e negligenciados em muitos campos de estudo (Buckley, 2008). No entanto, é reconhecido que os fungos exercem um importante papel nos ecossistemas, desempenhando um papel vital na cadeia alimentar como decompositores (Carlile *et al.*, 2001).

Os fungos estabelecem diferentes associações com outros organismos, sendo também importantes mutualistas, nomeadamente com plantas, sendo estimado que mais de 90% das plantas na natureza possuem micorrizas. Formam também associações mutualistas com algas e cianobactérias – líquenes (Gow & Gadd, 1996).

Por outro lado, muitos fungos são organismos patogénicos infectando um grande número de plantas e animais, do qual resulta, frequentemente, numa enorme perda económica e num aumento do número de doenças (Buckley, 2008). Os fungos podem causar doenças em humanos quer por infecção directa quer através da produção de toxinas, incluindo micotoxinas (Carlile *et al.*, 2001).

Adicionalmente, as leveduras e outros fungos são actualmente utilizados como máquinas de produção de vacinas, vitaminas e anticorpos policlonais para utilização em imunoterapia e outras terapêuticas (Buckley, 2008).

### **1.2.1- Fungos Filamentosos**

Os fungos filamentosos, vulgarmente chamados bolores e cogumelos, são constituídos por longos túbulos microscópicos ramificados denominados hifas que formam um novelo denominado micélio (Buckley, 2008).

As hifas podem estar divididas por paredes – septos, o que faz com que surjam compartimentos onde se encontram vários núcleos ou não, serem segmentadas. A segmentação torna estes compartimentos equivalentes a células (Papagianne, 2004). Os esporos são formados em células especializadas (Carlile *et al.*, 2001).

A área superficial relativa faz com que as hifas estejam bem adaptadas para a absorção, segregação e excreção de substâncias. Quando crescem em culturas submersas, os fungos filamentosos exibem diferentes formas morfológicas, dispondo-se desde filamentos miceliares dispersos até densas massas miceliares agregadas (Papagianne, 2004).

### **1.2.1.1- Fungos fitopatogénicos**

Os fungos fitopatogénicos são responsáveis por várias doenças em inúmeras culturas pelo mundo, causando graves perdas económicas aos agricultores e produtores de plantas ornamentais (Carlile *et al.*, 2001). Os fungos têm ciclos de vida complexos, possuindo várias formas de reprodução e dando origem a diferentes estruturas reprodutivas. Durante a infecção da planta os fungos produzem diferentes compostos essenciais para completar o processo de infecção, nomeadamente enzimas e toxinas (Fernandez-Acero, 2007).

### **I. Família Botryosphaeriaceae**

As espécies desta família pertencem à ordem *Botryosphaeriales*, à classe *Dothideomycetes*, ao filo *Ascomycota* e por fim ao Reino Fungi.

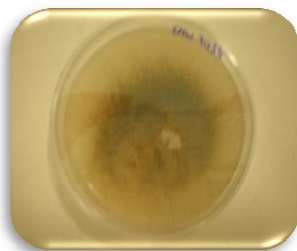
As espécies pertencentes a esta família são aparentemente ubíquas, não colonizando apenas as regiões polares (Crous *et al.*, 2006). Estas espécies aparecem associadas a uma variedade imensa de monocotiledóneas, dicotiledóneas e gimnospérmicas causando cancrios, “diebacks”, necroses, apodrecimento dos frutos, podridão branca ou podem aparecer como meros endófitos (Slippers & Wingfield, 2007). São frequentemente descritos como sendo patogénicos oportunistas, atacando as plantas quando estas passam por um período de *stress* (Dekker *et al.*, 2001).

Estudos sobre os vários aspectos biológicos de *Botryosphaeriaceae*, incluindo a sua natureza endófito, teve, durante muitos anos, vários reveses devido à enorme complexidade taxonómica deste grupo (Slippers & Wingfield, 2007). Contudo, estudos filogenéticos têm vindo a esclarecer algumas dúvidas dentro do grupo (Alves *et al.*, 2007).

Actualmente, mais de 2000 nomes estão associados a esta família, incluindo estados teleomorfos e anamorfos em que os géneros *Diplodia*, *Botryosphaeria*, *Fusicoccum*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* e *Sphaeropsis* contêm o maior número de espécies.

#### a) – Género *Botryosphaeria*

Na figura 9 mostra-se um isolado de uma espécie pertencente ao género *Botryosphaeria* e à família *Botryosphaeriaceae*.



**Fig. 9** Fotografia de *Botryosphaeria* sp.  
em meio OMA

Inicialmente estes fungos foram descritos como sendo saprófitos de tecidos mortos de plantas. Estudos posteriores destacaram o género *Botryosphaeria* e os seus géneros anamorfos como organismos patogénicos, especialmente na agricultura, produção e plantação de florestas, pois são organismos que atacam uma enorme variedade de plantas, essencialmente quando estas passam por um período de *stress* (seca, replantação, entre outros) (Slippers & Wingfield, 2007).

O género até há bem pouco tempo era definido apenas com base na morfologia e eram essas características que o diferenciavam de todos os outros géneros de fungos (Phillips, 2002).

Contudo, as técnicas moleculares, especialmente a análise de sequências de regiões variáveis do DNA ribossomal, têm sido utilizadas para clarificar a taxonomia do género e têm-se tornado uma ferramenta poderosa para a diferenciação das espécies, permitindo até distinguir espécies muito próximas (Phillips, 2002; Alves, 2006).

### **b) – Género *Neofusicoccum***

Espécies pertencentes a este género são consideradas patógenicas de inúmeras plantas por todo o globo, causando graves perdas económicas no sector agrícola (Pavlic, 2009).

Este género é conhecido por possuir espécies com um ciclo sexuado (teleomorfos) e espécies com um ciclo assexuado (anamorfos), sendo maioritariamente encontrados sob a forma anamorfa. Existem, no entanto, espécies para as quais não se conhece a fase sexuada. A reprodução sexual deste género ainda não está esclarecida e pouco se conhece sobre o processo de “*mating*” (Phillips, 2000).

O género *Neofusicoccum* é extremamente próximo do género *Botryosphaeria*, tanto que, até há bem pouco tempo, espécies agora pertencentes ao género *Neofusicoccum* faziam parte do género *Botryosphaeria*. Assim não é de estranhar que as características morfológicas destas duas espécies sejam semelhantes, o que torna difícil a sua correcta identificação, sendo então necessário recorrer a métodos de identificação moleculares (Pavlic, 2009).

### **c) – Género *Dothiorella***

O género *Dothiorella* foi reintroduzido para acomodar os anamorfos de *Botryosphaeria* que possuem conídios castanhos e 1-septados. Esta decisão baseou-se no estudo das características morfológicas da espécie tipo do género bem como em análises filogenéticas (Alves, 2006).

Espécies pertencentes a este género são patogénicas de uma variedade de plantas, causando cancos, apodrecimentos, causam podridão peduncular ocorrendo como endófitas em tecidos maduros da planta, colonizando a inflorescência e atingindo o pedúnculo do fruto algumas semanas após o florescimento. Estas infecções permanecem quiescentes até o amadurecimento do fruto (Poetz et al., 1994).



#### d) – Género *Diplodia*

Este género está distribuído por todo o globo e é de grande importância. Na América do Norte, este género causa cancos nas plantações de coníferas, sebes corta-vento e plantações de ornamentais (Phillips, 2000). Muitas das coníferas são susceptíveis a infecções, especialmente espécies exóticas. Nos Estados Unidos da América a espécie *Diplodia pinea* ataca principalmente espécies de pinheiros sujeitos a algum tipo de *stress* ambiental tais como: solos pobres, seca, estragos provocados pela neve, más práticas de cultivo e actividade de alguns insectos (Úrbez-Torres *et al.*, 2006).

O género *Diplodia* destrói as árvores atacando as primeiras folhas ano após ano ou causando cancos nas árvores sujeitas a *stress*. Também as sementes são afectadas, sendo que as sementes são mortas no primeiro ano de infecção.

A espécie *Diplodia pinea* sobrevive no inverno sob a forma de picnídios ou micélio nos estróbilos, cones, entre outros, do hospedeiro. Os esporos, conídios, são disseminados durante a época de chuva. O pico de produção de esporos ocorre aquando da elongação ou formação de novos brotos (Phillips, 2000).

O fungo invade os tecidos novos e formam picnídios nos tecidos mortos. Os esporos do ano podem ser disseminados no próprio ano ou no ano seguinte, a infecção também ocorre através de feridas causadas por diversos agentes (Slippers & Wingfield, 2007).



Fig. 10 Dano causado no pinheiro por *Diplodia* sp.

#### e) – Género *Lasiodiplodia*

As espécies do género *Lasiodiplodia* são patogénicas de uma variedade de plantas, causando cancos e apodrecimentos.

Em raras ocasiões estas estirpes podem causar queratite fúngica, doença que afecta a visão, mais propriamente a córnea (Sedó *et al.*, 2003), entre outras doenças (Summerbell *et al.*, 2004).

São espécies que existem em climas tropicais e sub-tropicais normalmente isoladas de plantas com algum tipo de dano ou de frutos com podridão (Summerbell *et al.*, 2004).

*Objetivos*

## ***Objectivos***

Este trabalho teve como objectivo geral a avaliação do potencial biotecnológico de vários isolados de fungos fitopatogénicos.

Especificamente pretendeu-se efectuar uma caracterização de enzimas extracelulares da família *Botryosphaeriaceae*.

Assim, os objectivos específicos foram:

- i) Determinar que enzimas extracelulares são produzidas pelos fungos em estudo;
- ii) Determinar os efeitos da temperatura na actividade das enzimas;
- iii) Efectuar uma purificação parcial de enzimas com elevado potencial biotecnológico.

## *Capítulo 2 – Materiais e Métodos*

## 2.1 – Espécies utilizadas

Na tabela I apresenta-se a listagem de todas as espécies utilizadas neste trabalho.

Todas as estirpes pertencentes à família *Botryosphaeriaceae* foram obtidas através do Doutor Artur Alves do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

As espécies com a denominação CAP foram isoladas e identificadas pelo Doutor Alan Phillips, da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. Foram também utilizadas espécies de referência da coleção de culturas de microrganismos CBS (“Centraalbureau voor Schimmelcultures”); as espécies com denominação CAA foram isoladas pelo Doutor Artur Alves.

**Tabela I:** Listagem de espécies utilizadas neste trabalho, sendo que as espécies numeradas de 1-14 do género *Neofusicoccum*, 15-24 do género *Dothiorella*, 25-38 do género *Diplodia*, 39-47 do género *Botryosphaeria* e 48-53 do género *Lasiodiplodia*.

Nº	Espécie	Estirpe	Hospedeiro	Local
1	<i>N. luteum</i>	CAP 037	<i>Vitis vinifera</i>	Portugal
2	<i>N. parvum</i>	CAP 155	<i>Vitis vinifera</i>	França
3	<i>N. parvum</i>	CAP 156	<i>Vitis vinifera</i>	França
4	<i>N. parvum</i>	CAP 186	<i>Vaccinium corymbosum</i>	Portugal
5	<i>N. parvum</i>	CMW 9081	<i>Populus nigra</i>	Nova Zelândia
6	<i>N. australe</i>	CAP 188	<i>Rubus</i> sp.	Portugal
7	<i>N. australe</i>	CAP 189	<i>Rubus</i> sp.	Portugal
8	<i>N. australe</i>	CAA 018	<i>Pinus pinaster</i>	Portugal
9	<i>N. mediterraneum</i>	CAA 001	<i>Pistacia vera</i>	EUA
10	<i>N. mediterraneum</i>	CAA 002	<i>Pistacia vera</i>	EUA
11	<i>N. vitifusiforme</i>	JL 563	<i>Vitis vinifera</i>	Espanha
12	<i>N. ribis</i>	CMW 7054	<i>Ribes rubrum</i>	Desconhecido
13	<i>N. ribis</i>	CMW 7772	<i>Ribes</i> sp.	EUA
14	<i>N. ribis</i>	CMW 7773	<i>Ribes</i> sp.	EUA
15	<i>Do. iberica</i>	CAP 145	<i>Quercus ilex</i>	Espanha
16	<i>Do. iberica</i>	CAP 146	<i>Quercus ilex</i>	Espanha
17	<i>Dothiorella</i> sp.	CAP 187	<i>Prunus dulcis</i>	Portugal
18	<i>Dothiorella</i> sp.	CAA 005	<i>Pistacia vera</i>	EUA
19	<i>Dothiorella</i> sp.	JL 599	<i>Corylus avellana</i>	Espanha
20	<i>Do. viticola</i>	JL 412	<i>Vitis vinifera</i>	Espanha
21	<i>Do. viticola</i>	JL 571	<i>Vitis vinifera</i>	Espanha

22	<i>Do. sarmentorum</i>	CBS 165.33	<i>Prunus armeniaca</i>	Desconhecido
23	<i>Do. sarmentorum</i>	CBS 120.41	<i>Pyrus communis</i>	Noruega
24	<i>Do. sarmentorum</i>	CAP 147	<i>Malus pumila</i>	Holanda
25	<i>D. seriata</i>	CAP 148	<i>Vitis vinifera</i>	Itália
26	<i>D. seriata</i>	CAP 149	<i>Malus sp.</i>	Portugal
27	<i>D. seriata</i>	CAP 150	<i>Cydonia oblonga</i>	Portugal
28	<i>D. seriata</i>	CAP 154	<i>Vitis vinifera</i>	França
29	<i>D. pinea</i>	CAA 015	<i>Pinus pinaster</i>	Portugal
30	<i>D. pinea</i>	CBS 109726	<i>Pinus patula</i>	África do Sul
31	<i>D. pinea</i>	CBS 109943	<i>Pinus patula</i>	Indonésia
32	<i>D. cupressi</i>	CAA 027	<i>Juniperus scopulorum</i>	EUA
33	<i>D. cupressi</i>	CAA 028	<i>Juniperus scopulorum</i>	EUA
34	<i>D. mutila</i>	JL 375	<i>Fraxinus excelsior</i>	Espanha
35	<i>D. mutila</i>	CBS 230.30	<i>Phoenix dactylifera</i>	EUA
36	<i>D. phoenicum</i>	JL 515	<i>Phoenix canariensis</i>	Espanha
37	<i>D. phoenicum</i>	JL 574	<i>Phoenix dactylifera</i>	Espanha
38	<i>D. scrobiculata</i>	CBS 113423	<i>Pinus greggii</i> o	México
39	<i>B. dothidea</i>	CAP 153	<i>Vitis vinifera</i>	França
40	<i>B. dothidea</i>	CAP 190	<i>P. resinosa</i>	EUA
41	<i>B. dothidea</i>	CMW 8000	<i>Prunus sp.</i>	Suíça
42	<i>B. melanops</i>	CAP 180	<i>Quercus robur</i>	Alemanha
43	<i>B. melanops</i>	CAP 181	<i>Quercus robur</i>	Alemanha
44	<i>B. corticis</i>	CAP 197	<i>Vaccinium corymbosum</i>	EUA
45	<i>B. corticis</i>	CAP 198	<i>Vaccinium corymbosum</i>	EUA
46	<i>B. corticis</i>	96.123	<i>Vaccinium sp.</i>	EUA
47	<i>B. corticis</i>	96.124	<i>Vaccinium sp.</i>	EUA
48	<i>L. theobromae</i>	CAA 012	<i>Pistacia vera</i>	EUA
49	<i>L. theobromae</i>	CAA 019	<i>Cocos nucifera</i>	Brasil
50	<i>L. gonubiensis</i>	CBS 115812	<i>Syzygium cordatum</i>	África do Sul
51	<i>L. parva</i>	CBS 456.78	Isolado de solo	Colômbia
52	<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 447.62	<i>Citrus aurantium</i> e	Suriname
53	<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 116459	<i>Gmelina arborea</i>	Costa Rica

## 2.2 – Meios de cultura

Todos os meios de cultura aqui descritos têm a sua composição calculada para 1L e após a sua execução foram autoclavados a 120°C durante 15 minutos.

### 2.2.1 – Meios para crescimento de fungos

**Meio OMA** (adaptado de Phillips, 2002)

Flocos de aveia	20g
Agar	20g
Água destilada	até 1L

Os flocos de aveia são fervidos em 300mL de água destilada e filtrados através de gaze, e perfazendo-se posteriormente o volume com água destilada até 1L.

### 2.2.2 – Meios sólidos para detecção e determinação da actividade enzimática extracelular

Foram utilizados meios de cultura para a detecção da actividade enzimática extracelular das seguintes enzimas: pectinases, pectina liases, amilases, quitinases, lipases, xilanases, proteases, ureases, celulasas e lacases.

Os mesmos meios foram utilizados na determinação da actividade enzimática, no entanto sem agar.

**Meio de pectina** (adaptado de Hankin e Anagnostakis, 1975 e St Leger *et al.*, 1997)

NaNO <sub>3</sub>	0,3g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1g
MgSO <sub>4</sub>	0,5g
Extracto de levedura	1g
Pectina	5g
Bacto-agar	15g



**Nota:** Dependendo do valor de pH do meio é possível detectar a actividade das pectinases, a pH= 7,0 ou a actividade de pectinases, a pH=5,0.

**Meio de amido** (adaptado de Hankin e Anagnostakis, 1975)

Peptona	10g
Extracto de levedura	5g
NaCl	5g
Amido	2g
Bacto-agar	15g

**Nota:** ajustar o pH do meio a 6,8.

**Meio de Lipase** (adaptado de Hankin e Anagnostakis, 1975)

Peptona	10g
NaCl	5g
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,1g
Tween 20	1% (v/v)
Bacto-agar	20g

**Nota:** O Tween 20 é utilizado como substrato lipídico, este é esterilizado separadamente dos restantes reagentes através de autoclavagem (120°C durante 15 min.). Sendo depois adicionado ao restante meio esterilizado na proporção de 1% (v/v).

**Meio de xilanase** (adaptado de St Leger *et al.*, 1997)

NaNO <sub>3</sub>	0,3g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1g
MgSO <sub>4</sub>	0,5g
Extracto de levedura	1g
Xilano	5g
Bacto-agar	15g

**Meio de Skim Milk** (adaptado de Alves, 2006)

Skim Milk	10g
Extracto de malte	5g
Bacto-agar	15g

**Nota:** O *Skim milk* é esterilizado à parte dos restantes reagentes, fazendo-se no final da esterilização a junção de todos os reagentes.

**Meio de urease** (adaptado de Hankin e Anagnostakis, 1975)

Peptona	1g
D(+)-glucose	1g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2g
NaCl	5g
Vermelho de fenol	0,012g
Bacto-agar	15g

**Nota:** Após a esterilização do meio, por autoclavagem, deixar arrefecer a 45-55°C e adicionar 50 ml/l de uma solução de ureia a 40% (m/v), esterilizada por filtração.

**Meio de celulose** (adaptado de St Leger *et al.*, 1997)

NaNO <sub>3</sub>	0,3g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1g
MgSO <sub>4</sub>	0,5g
Extracto de levedura	1g
CM-celulose	5g
Bacto-agar	15g

**Meio de TAM** (adaptado de Rigling, 1995)

Extracto de Malte	15g
Bacto-agar	20g

**Nota:** O ácido tânico é esterilizado separadamente dos restantes reagentes em metade do volume de água destilada utilizada. Posteriormente procede-se à junção das diferentes partes, devidamente esterilizadas.

## 2.3 – Detecção de actividades enzimáticas extracelulares

Os diferentes meios selectivos foram espalhados em placas de Petri de 52mm de diâmetro. Posteriormente foi inoculada uma porção de micélio (7mm de diâmetro) no centro da placa e deixou-se crescer à temperatura ambiente.

Após o crescimento dos fungos procedeu-se à análise do meio de cultura segundo o que se descreve em seguida:

**Proteases** – observação directa da placa: após o crescimento do micélio verificar a formação ou não de um halo transparente em volta da colónia, sendo a presença de

enzimas extracelulares detectada pela formação do halo (modificado de Hankin e Anagnostakis, 1975);

**Lacases e ureases** – observação directa da placa: após o crescimento à temperatura ambiente do micélio verificar mudança ou não de cor do meio: a alteração de cor indica presença de enzimas extracelulares (segundo Dekker, 2001 ; Hankin e Anagnostakis, 1975 respectivamente). A alteração de cor do meio de lacase deve-se à oxidação do substrato (ácido tânico) em volta do micélio.

A alteração de cor do meio de Urease deve-se à presença de um indicador de pH. Aquando da degradação do meio por parte do grupo de enzimas dá-se uma alteração do valor de pH em que o indicador atinge o seu ponto de viragem.

**Lipases** – observação directa da placa: após o crescimento do micélio, à temperatura ambiente, verificar a formação ou não de cristais de cálcio na zona envolvente do micélio: a formação de cristais de cálcio revela a presença de enzimas extracelulares (Hankin e Anagnostakis, 1975);

**Pectinases** – após o crescimento do micélio à temperatura ambiente, adicionar 1mL de CTAB 1% (m/v) à placa, aguardar 1h e observar a formação ou não de um halo transparente em volta da colónia do fungo. A presença de enzimas extracelulares é verificada aquando da formação de halo em volta da colónia (adaptado de St Leger *et al.*, 1997). O CTAB age como um detergente, solubilizando um material insolúvel em água na sua parte apolar sob forma de micelas, assim o meio não degradado torna-se opaco possibilitando a observação de um halo de degradação produzido pelo grupo de enzimas em estudo.

**Xilanases e Celulases** – após o crescimento do micélio à temperatura ambiente, adicionar 1mL de vermelho do Congo, aguardar 5 min e lavar com NaCl 1M. Observar a formação ou não de um halo transparente em volta da colónia. A formação de halo em volta da colónia é indicativo da presença de enzimas extracelulares (adaptado de St Leger *et al.*, 1997). O vermelho do Congo cora o meio não degradado pelo grupo de enzimas,

colocando assim em evidência a zona de degradação do mesmo por parte do grupo de enzimas (formação de halo).

**Amilases** – após o crescimento do micélio à temperatura ambiente, adicionar soluto de Lugol e observar a formação ou não de um halo transparente em volta da colónia: formação de halo em volta da colónia é indicativo da presença de enzimas extracelulares (adaptado de Hankin e Anagnostakis, 1975). O soluto de Lugol cora o meio não degradado pelo grupo de enzimas, colocando assim em evidência a zona de degradação do mesmo por parte do grupo de enzimas (formação de halo).

## **2.4 – Quantificação da actividade enzimática**

### **2.4.1 – Espectrofotometria**

Os métodos de espectrofotometria baseiam-se na absorção e/ou emissão de radiação electromagnética por moléculas, quando os seus electrões se movimentam entre níveis energéticos diferentes (Gordon, 1995).

#### **2.4.1.1 – Proteases**

##### **I – Crescimento dos isolados**

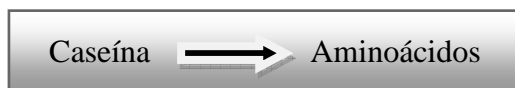
Os isolados, previamente crescidos em meio sólido OMA, foram transferidos para meio líquido PDA (50mL) em *erlenmeyers* de 250mL, utilizando para o efeito um inóculo com 7mm de diâmetro. Após 14 dias de crescimento à temperatura ambiente e sem agitação, o meio extracelular foi recolhido por centrifugação, designando-se por “extracto” a partir deste ponto. A actividade do extracto foi medida segundo a metodologia descrita em seguida.

##### **II – Determinação da actividade proteolítica**

Para a determinação da actividade proteolítica extracelular dos isolados em estudo, foi utilizado o seguinte procedimento, de acordo com Kembhavi, Kulkarni, e Panti (1993):

- 
- Colocar em tubos de 2mL:
    - 1,5mL de caseína 2 % (m/v);
    - 500µL de extracto enzimático;
  - Incubar os tubos a 37, 50 e 70°C;
  - Retirar 450µL ao fim de 0; 30; 60 e 120 min para tubos de 1,5mL;
  - Adicionar 900µL de TCA 5% (m/v);
  - Agitar e centrifugar 13500 rpm durante 5 minutos;
  - Retirar o sobrenadante para um novo tubo e medir a absorvância a 280nm em cuvete de quartzo.
-

Assim, teremos como equação de hidrólise de caseína por acção de proteases:



#### 2.4.1.2– Lacases

##### I – Crescimento das estirpes

Os isolados, previamente crescidos em meio sólido OMA, foram transferidos para meio líquido TAM (50mL) em *erlenmeyers* de 125mL, utilizando para o efeito um inóculo com 7mm de diâmetro. Após 14 dias de crescimento à temperatura ambiente e sem agitação, o meio extracelular foi recolhido por centrifugação, designando-se por “extracto” a partir deste ponto, e a actividade enzimática medida segundo a metodologia descrita em seguida.

##### II – Determinação da actividade lenhinolítica

Para a determinação da actividade lenhinolítica extracelular dos isolados em estudo foi utilizado o seguinte procedimento, de acordo com Vasconcelos *et al.*, 2000:

- 
- colocar 760  $\mu$ L de Tampão McIlvaine (ácido cítrico 0,1M;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,2M) 170mM pH 6,5, a 50 °C, num tubo;
  - adicionar 40  $\mu$ L de DMP 50mM;
  - iniciar a reacção com 200  $\mu$ L de extracto;
  - registar a absorvância continuamente a 468nm durante 10min a 50°C.
- 

Assim teremos como equação de oxidação do ácido tânico por acção de lacases:



### 2.4.1.3– Celulases

#### I – Crescimento das estirpes

Os isolados, previamente crescidos em meio sólido OMA, foram transferidos para meio líquido Celulases (50mL) em *erlenmeyers* de 125mL, utilizando para o efeito um inóculo com 7mm de diâmetro. Após 14 dias de crescimento à temperatura ambiente e sem agitação, o meio extracelular foi recolhido por centrifugação, designando-se por “extracto” a partir deste ponto, e a actividade enzimática medida segundo a metodologia descrita em seguida.

#### II – Determinação da actividade celulolítica

Para a determinação da actividade celulolítica extracelular dos isolados em estudo foi utilizado o seguinte procedimento (adaptado de Dekker *et al.*, 2001):

- 
- num tubo de 2 mL colocar:
    - 1,9mL de tampão fosfato de sódio 50mM pH 5,0;
    - 100µL de extracto, num tubo de 1,5mL;
    - uma tira de papel filtro (1cmx2,5cm), previamente esterilizada,
  - num tubo de 2mL colocar:
    - 1,9mL de tampão fosfato de sódio 50mM pH 5,0;
    - 100µL de extracto, num tubo de 1,5mL;
    - 20mg de CMC;
  - incubar os tubos a 37°C, 50°C e 70°C;
  - retirar 450µL ao fim de 0; 20; 40 e 60 min para tubos de 2mL;
  - adicionar 900µL de DNS;
  - agitar;
  - incubar os tubos a 100°C por 10 min;
  - ler a absorvância a 540nm.
-



**Nota:** O método acima descrito contempla o estudo da actividade enzimática celulolítica total (Papel de filtro como substrato) e da actividade enzimática de endoglucanases (carboximetilcelulose como substrato).

Assim, teremos como equação de hidrólise da celulose por acção de celulasas.



## 2.4.2 – Método titrimétrico

O método titrimétrico fundamenta-se na titulação alcalina de iões de hidrogénio libertados na dissociação de ácidos gordos, resultantes da acção das lipases, neste caso, sobre as moléculas de triglicerídeos (Skoog *et al.*, 2007).

Assim, teremos como equação de dissociação de ácidos gordos por acção de lipases:



### 2.4.2.1 Lipases

#### I – Crescimento das estirpes

Os isolados, previamente crescidos em meio sólido OMA, foram transferidos para meio líquido Lipase (50mL) em *erlenmeyers* de 125mL, utilizando para o efeito um inóculo com 7mm de diâmetro. Após 14 dias de crescimento à temperatura ambiente e sem agitação, o meio extracelular foi recolhido por centrifugação, designando-se por “extracto” a partir deste ponto, e a actividade enzimática medida segundo a metodologia descrita em seguida.

#### II – Determinação da actividade lipolítica

Para a determinação da actividade lipolítica extracelular dos isolados em estudo foi utilizado o seguinte procedimento (adaptado de Lima *et al.*, 2004):

- 
- preparar uma solução de azeite em emulsão:
    - adicionar:
      - 20% de azeite;
      - 6% de trietanolamina;
      - 74% de tampão fosfato de sódio 50mM a pH 8.0;
    - agitar durante 30min a 37°C;
  - juntar a um Erlenmeyer de 125mL:
    - 2,5mL de emulsão
    - 1mL de extracto;
  - incubar com agitação (220 rpm) 37°C ou 55°C;
  - retirar 800 µL ao fim de 0, 20, 40 e 90 min
  - adicionar 6 mL de uma solução 1:1 (v/v) de etanol e acetona;
  - adicionar ao tubo 500 µL de indicador de pH - fenolftaleína 0,05% (m/v);
  - titular com NaOH 50mM;
- 

A partir do volume utilizado de titulante calcula-se a actividade proteolítica extracelular através da fórmula (adaptado Colen, 2006):

$$Actividade\ lipolítica = \frac{(V_{enzima} - V_{controlo}) \times FC \times D \times 50}{t}$$

Onde:

$V_{enzima}$  = volume de NaOH utilizado na titulação do extracto;

$V_{controlo}$  = volume de NaOH utilizado na titulação do controlo;

FC = Factor de correcção;

D = factor de diluição;

50 = Factor aplicado para expressar o resultado em µmol de ácido gordo libertado por ml de amostra;

t = tempo de reacção em minutos.

## **2.5– Zimografia**

As amostras foram preparadas a partir dos extractos do meio de cultura dos fungos e incubadas [1:1 (v/v)] com tampão de carga (Tris 1,5M; SDS 10%; Glicerol; água bidestilada), e aplicadas em gel de poliacrilamida contendo SDS.

Os géis de poliacrilamida (Laemmli, 1970) foram preparados contendo gelatina como substrato.

### **Gel de Separação (10% com 0,1% Gelatina)**

Água destilada	3,34 mL
Tris 1,5 mM a pH 8,8	3,36 mL
Acrilamida : Bisacrilamida 40%(v/v)	2,5 mL
Gelatina (1%) (m/v)	500 µL
SDS a 10% (v/v)	200 µL
Persulfato de amónia a 10% (m/v)	100 µL
TEMED	10 µL

Após a aplicação do gel de separação no suporte, adicionar isopropanol a 50% (v/v), sobre o topo do gel e deixar polimerizar durante 30 min à temperatura ambiente. Após polimerização, remover o isopropanol e adicionar o gel de concentração de acordo com o descrito em seguida:

### **Gel de Concentração (4%)**

Água destilada	3,36 mL
Tris 0,625 mM a pH 6,8	1,25 mL
Acrilamida : Bisacrilamida 40%(v/v)	0,488 µL
SDS a 10% (m/v)	100 µL
Persulfato de amónia a 10% (m/v)	50µL
TEMED	2,5 µL

Deixar polimerizar o gel durante 30 min à temperatura ambiente. Após polimerização aplicar 30µL de amostra em cada poço, e dar início à electroforese a uma voltagem

constante de 150 V durante 80 minutos em ambiente refrigerado. O tampão de corrida é constituído por Tris:Bicina 100mM e SDS 0,1% (m/v).

Após a electroforese incubar os géis durante 30 minutos em tampão de renaturação [Triton X-100 2,5% (v/v)], sob leve agitação para remoção do SDS. Posteriormente incubar em tampão de reacção (Tris 50mM a pH 8,8; NaCl 5mM; CaCl<sub>2</sub> 10mM; água bidestilada ajustar o pH para 7,4) durante 2h, a 37°C.

Após a incubação em tampão de reacção, revelar os géis por coloração com *Coomassie Brilliant Blue* R-250 (CBB). Assim, incubar os géis em solução corante [CBB 0,4% (m/v), etanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v)], durante 30 minutos, à temperatura ambiente e sob ligeira agitação. De seguida efectuar a descoloração dos géis com solução descorante [etanol 25% (v/v), ácido acético 5% (v/v)]. Após a coloração, proceder à digitalização dos géis [neste trabalho utilizou-se o densitómetro GS-710<sup>TM</sup> *Calibrated Imaging Densitometer* (Bio-Rad)].

## 2.6– Quantificação de proteínas

O método BCA Protein Assay Kit é uma formulação baseada no ácido bicinronínico (BCA) para a detecção colorimétrica e quantificação total de proteínas. Este método combina a redução do Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>1+</sup>, pelas proteínas, em meio alcalino (reacção de biureto) com a alta sensibilidade e selectividade da detecção do catião de cobre utilizando um reagente contendo ácido bicinronínico (Smith *et al.*, 1985).

A estrutura macromolecular da proteína, o número de péptidos ligados e a presença de quatro aminoácidos específicos (cisteína, cistina, triptofano e tirosina) são tidos como os responsáveis pela reacção colorimétrica com o BCA (Wiechelman *et al.*, 1988).

A concentração de proteína foi determinada (BSA Protein Assay Kit) tendo em conta um padrão de referência como a albumina sérica bovina (BSA). Foram feitas diluições de uma concentração conhecida de uma proteína também conhecida e é posteriormente realizada uma curva de calibração.

## 2.7– Purificação de enzimas por Cromatografia

O botânico russo Michail Semenovitch Tswett é tido como o “pai” da cromatografia, tendo descoberto a técnica no início do séc. XX. Posteriormente, muitos cientistas contribuíram para o avanço da teoria e da prática da cromatografia e estima-se que actualmente cerca de 60% das análises feitas no mundo envolvem esta técnica (Cazes, 2005).

Na cromatografia os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases, a fase estacionária e a fase móvel. A cromatografia é o resultado de processos repetidos de adsorção durante o movimento dos componentes da amostra ao longo da fase estacionária, e a separação é devida à diferença de constantes de distribuição de cada um dos componentes da amostra (Scott, 2006).

### **2.7.1 – Cromatografia por exclusão molecular**

A cromatografia por exclusão molecular também chamada de filtração em gel é uma técnica muito eficiente, que separa moléculas pelo seu peso molecular (Engel, 1999).

Esta técnica utiliza partículas porosas para separar as moléculas, sendo utilizada, geralmente, para separar moléculas biológicas, determinar pesos moleculares e também avaliar distribuições de pesos moleculares de polímeros (Cazes, 2005).

As moléculas mais pequenas que o tamanho dos poros das partículas que constituem a resina, podem entrar na partícula, possuindo assim um tempo de retenção maior. Por outro lado, as moléculas maiores percorrem um percurso menor e consequentemente levam menos tempo a sair da coluna (Engel, 1999; Cazes, 2005)

Algumas características da fase estacionária devem ser respeitadas para que haja melhor separação, como o tamanho do poro adequado, superfície inerte, rigidez mecânica, geometria invariável a mudanças de pH e força iónica (Collins *et al.*, 2006).

Para a cromatografia, foi utilizado como fase estacionária a resina Superdex 75 que separa substâncias com pesos moleculares de 3.000 a 70.000 Da e como eluente o tampão Tris 25 mM pH 7,6.

O tampão foi filtrado sob vácuo com filtro de éster celulose de porosidade 0,2µm (Schleicher & Schuell) e posteriormente desgaseificado com He (g) durante 5 segundos.

A amostra foi filtrada através de filtros de seringa de 0,2µm de porosidade (Orange Scientific).

A amostra (10mL) foi aplicada na coluna. O eluente, que é continuamente bombeado para a coluna, vai arrastando os componentes da amostra para o topo e depois ao longo da coluna.

## *Capítulo 3 – Resultados e discussão*

O trabalho aqui apresentado foi desenvolvido com o objectivo de detectar e quantificar enzimas extracelulares de diferentes classes, produzidas por 53 isolados pertencentes à família *Botryosphaeriaceae*. Para tal foram seguidas metodologias, descritas no capítulo 2.

### 3.1 – Detecção de enzimas extracelulares

O isolamento e detecção de microrganismos potencialmente produtores de enzimas tem-se tornado uma necessidade crescente, pois não só nos permitem entender o seu papel no mecanismo de patogenicidade (no caso de microrganismos patogénicos) como também melhorar a sua aplicação através da biotecnologia ou, eventualmente, encontrar actividades desconhecidas úteis em termos biotecnológicos. Para tal é necessária a utilização de técnicas rápidas e sensíveis para a detecção e caracterização dos microrganismos (Saran *et al.*, 2007).

A detecção de enzimas em placa é uma técnica que se encaixa no perfil apresentado por Saran e co-autores (2007) no seu trabalho. A sensibilidade do método advém da utilização de meios selectivos, tornando assim, também, a técnica muito específica. A degradação do meio por parte da enzima produzida pelo microrganismo torna fácil a sua detecção.



**Fig. 11**-Fotografia de uma estirpe inoculada em meio Xilanase



**Fig. 12**-Fotografia de uma estirpe em placa de meio Pectinase.



**Fig. 13**-Fotografia de uma estirpe inoculada em meio Celulase

As figuras 11-14 são exemplos representativos dos resultados que se obtêm após inoculação de isolados que produzem xilanases (figura 11), pectinases (figura 12), celulasas (figura 13) e lipases (figura 14) extracelulares. Como se pode verificar, a detecção destas enzimas é efectuada por inspecção visual dos meios após crescimento do isolado. Assim, e dependendo do meio/enzima em questão poder-se-á verificar a formação de um halo em torno do isolado (figuras 11-13) ou a formação de um precipitado, como se



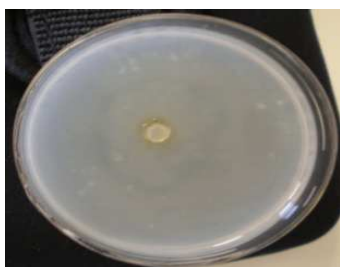
pode verificar na figura 14. A ausência de um halo ou do precipitado (no caso de lipases) corresponderia a um resultado negativo, i.e., corresponderia à não produção de enzimas extracelulares (em quantidade detectável).



**Fig. 14-** Fotografia de um isolado produtor de lipase, inoculado em meio lipase

O crescimento de um isolado produtor de lipases extracelulares em meio de lipases, origina a formação de cristais de cálcio. De acordo com Hankin & Anagnostakis (1975), a formação de cristais de cálcio do ácido láurico deve-se à completa degradação dos sais lipídicos em meios contendo sorbitol monolaurato (tween 20) como substrato lipídico.

Um resultado negativo seria a ausência de cristais de cálcio, após o crescimento do isolado.



**Fig. 15-** Fotografia de um isolado inoculado em meio SM



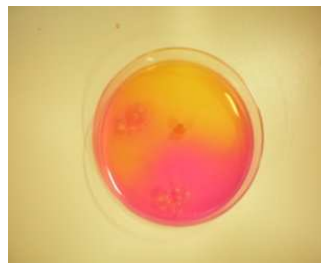
**Fig. 16-** Fotografia de um isolado inoculado em meio amilase

Relativamente à detecção de proteases (figura 15) e de amilases (figura 16), após o crescimento dos isolados produtores forma-se um halo, correspondente à degradação do substrato, em volta do micélio. Assim, a presença desse halo indica-nos que a estirpe produz enzima(s) capaz(es) de degradar o substrato e que esta(s) é(são) expelidas para o exterior do micélio.

A ausência de enzimas extracelulares ou em pequena concentração, isto é, um resultado negativo, é identificado pela não formação deste halo.



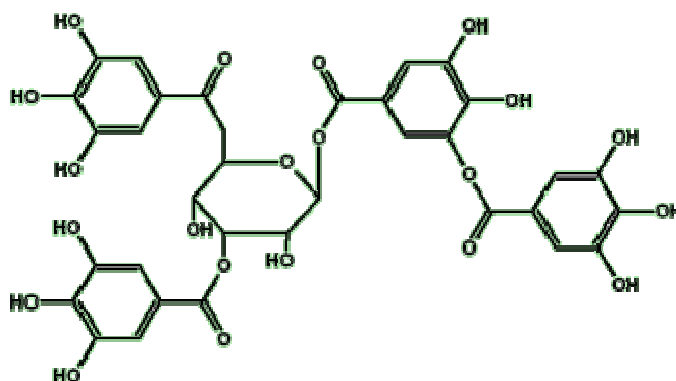
**Fig. 17-** Fotografia de um isolado inoculado em meio TAM



**Fig. 18-** Fotografia de um isolado inoculado em meio Urease

A presença de lacases extracelulares é identificada pela alteração da cor do meio, em volta do micélio, como se pode observar pela figura 17.

As lacases catalisam a oxidação de uma variedade de substratos como os polifenóis, diaminas e alguns compostos inorgânicos. As reacções de oxidação com a lacase envolvem a transferência de electrões de uma molécula para outra. Neste caso a lacase tinha como substrato um polifenol (ácido tânico, figura 19) (Leitner *et al.*, 2002).



**Fig. 19** - Estrutura química do ácido tânico

Relativamente à detecção de ureases (figura 18) utilizou-se um meio selectivo com indicador de pH. Deste modo, quando há produção de ureases, o valor de pH do meio é alterado de 7 para 9, induzindo uma alteração observável da cor do meio.

Neste trabalho foram estudados 53 isolados de fungos filamentosos pertencentes à família *Botryosphaariaceae*. Na tabela 1 encontram-se os resultados obtidos relativamente à presença ou ausência de enzimas extracelulares em todos os isolados utilizados neste trabalho.

Analisando a tabela podemos verificar que a grande maioria dos isolados possui todas as enzimas extracelulares analisadas. Vários autores, incluindo Slippers & Wingfield (2007), identificam a produção de enzimas extracelulares como sendo factores de virulência, associadas ao processo de infecção dos fungos da família *Botryosphaeraceae*.

**Tabela 2:** Presença ou ausência das várias enzimas extracelulares, nos isolados do género *Neofusicoccum* em estudo.

Nº	Espécie	Estirpe	Protease	Celulase	Xilanase	Lipase	Lacase	Urease	Amilase	Pectinase
1	<i>N. luteum</i>	CAP 037	+	+	+	+	+	+	+	+
2	<i>N. parvum</i>	CAP 155	+	+	+	+	+	+	+	+
3	<i>N. parvum</i>	CAP 156	+	+	+	+	+	+	+	+
4	<i>N. parvum</i>	CAP 186	+	+	+	+	+	+	+	+
5	<i>N. parvum</i>	CMW 9081	+	+	+	+	+	+	+	+
6	<i>N. australe</i>	CAP 188	+	+	+	+	+	+	+	+
7	<i>N. australe</i>	CAP 189	+	+	+	+	+	+	+	+
8	<i>N. australe</i>	CAA 18	+	+	+	+	+	+	+	+
9	<i>N. mediterraneum</i>	CAA 001	+	+	+	+	+	+	+	+
10	<i>N. mediterraneum</i>	CAA 002	+	+	+	+	+	+	+	+
11	<i>N. vitifusiforme</i>	JL 563	+	+	+	+	+	+	+	+
12	<i>N. ribis</i>	CMW 7054	+	+	+	+	+	+	+	+
13	<i>N. ribis</i>	CMW 7772	+	+	+	+	+	+	+	+
14	<i>N. ribis</i>	CMW 7773	+	+	+	+	+	+	+	+

**Tabela 3:** Presença ou ausência das várias enzimas extracelulares, nos isolados do género *Dothiorella* em estudo.

Nº	Espécie	Estirpe	Protease	Celulase	Xilanase	Lipase	Lacase	Urease	Amilase	Pectinase
15	<i>Do. iberica</i>	CAP 145	+	+	+	+	+	+	+	+
16	<i>Do. iberica</i>	CAP 146	+	+	+	-	+	+	+	+
17	<i>Dothiorella sp.</i>	CAP 187	+	+	+	+	+	+	+	+
18	<i>Dothiorella sp.</i>	CAA 005	+	+	+	+	+	+	+	+

19	<i>Dothiorella sp.</i>	JL 599	+	+	+	+	+	+	+	+
20	<i>Do. viticola</i>	JL 412	+	+	+	+	+	+	+	+
21	<i>Do. viticola</i>	JL 571	+	+	+	+	+	+	+	+
22	<i>Do. sarmentorum</i>	CBS 165.33	+	+	+	+	+	-	+	+
23	<i>Do. sarmentorum</i>	CBS 120.41	+	+	+	+	+	+	+	+
24	<i>Do. sarmentorum</i>	CAP 147	+	+	+	+	+	+	+	+

**Tabela 4:** Presença ou ausência das várias enzimas extracelulares, nos isolados do género *Diplodia* em estudo.

Nº	Espécie	Estirpe	Protease	Celulase	Xilanase	Lipase	Lacase	Urease	Amilase	Pectinase
25	<i>D. seriata</i>	CAP 148	+	+	+	+	+	+	+	+
26	<i>D. seriata</i>	CAP 149	+	+	+	+	+	-	+	+
27	<i>D. seriata</i>	CAP 150	+	+	+	+	+	+	+	+
28	<i>D. seriata</i>	CAP 154	+	+	+	-	+	+	+	+
29	<i>D. pinea</i>	CAA 015	+	+	+	-	+	+	+	+
30	<i>D. pinea</i>	CBS 109726	+	+	+	+	+	+	+	+
31	<i>D. pinea</i>	CBS 109943	-	+	+	+	+	+	+	+
32	<i>D. cupressi</i>	CAA 027	+	+	+	+	+	+	+	+
33	<i>D. cupressi</i>	CAA 028	+	+	+	+	+	+	+	+
34	<i>D. mutila</i>	JL 375	+	+	+	+	+	+	+	+
35	<i>D. mutila</i>	CBS 230.30	+	+	+	+	+	+	+	+
36	<i>D. phoenicum</i>	JL 515	+	+	+	+	+	+	+	+
37	<i>D. phoenicum</i>	JL 574	+	+	+	+	+	+	+	+
38	<i>D. scrobiculata</i>	CBS 113423	-	+	+	+	+	+	+	+

**Tabela 5:** Presença ou ausência das várias enzimas extracelulares, nos isolados do género *Botryosphaeria* em estudo.

Nº	Espécie	Estirpe	Protease	Celulase	Xilanase	Lipase	Lacase	Urease	Amilase	Pectinase
39	<i>B. dothidea</i>	CAP 153	+	+	+	+	+	+	+	+
40	<i>B. dothidea</i>	CAP 190	+	+	+	-	+	+	+	+
41	<i>B. dothidea</i>	CMW 8000	+	+	+	+	+	+	+	+
42	<i>B. melanops</i>	CAP 180	+	+	+	+	+	+	+	+
43	<i>B. melanops</i>	CAP 181	+	+	+	+	+	+	-	+
44	<i>B. corticis</i>	CAP 197	+	+	+	+	+	+	+	-
45	<i>B. corticis</i>	CAP 198	+	+	+	+	+	+	+	+
46	<i>B. corticis</i>	96.123	+	+	+	+	+	+	+	-
47	<i>B. corticis</i>	96.124	+	+	+	+	+	+	+	+

**Tabela 6:** Presença ou ausência das várias enzimas extracelulares, nos isolados do género *Lasiodiplodia* em estudo.

Nº	Espécie	Estirpe	Protease	Celulase	Xilanase	Lipase	Lacase	Urease	Amilase	Pectinase
48	<i>L. theobromae</i>	CAA 12	+	+	+	+	+	+	+	+
49	<i>L. theobromae</i>	CAA 19	+	+	+	+	+	+	+	+
50	<i>L. gonubiensis</i>	CBS 115812	+	+	+	+	+	+	+	+
51	<i>L. parva</i>	CBS 456.78	+	+	+	+	+	+	+	+
52	<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 447.62	-	+	+	+	+	+	+	-
53	<i>L. pseudotheobromae</i>	CBS 116459	+	+	+	-	+	+	+	+

### 3.2 – Quantificação de actividades enzimáticas extracelulares

Neste trabalho as actividades enzimáticas extracelulares foram quantificadas por dois métodos: espectrofotométrico e titrimétrico.

O método espectrofotométrico baseia-se na absorção de radiação nos comprimentos de onda entre o infravermelho e o ultravioleta. Consiste em fazer passar um feixe de luz através de uma solução, e posteriormente medir a quantidade de luz absorvida por essa mesma solução (Gordon, 1995).

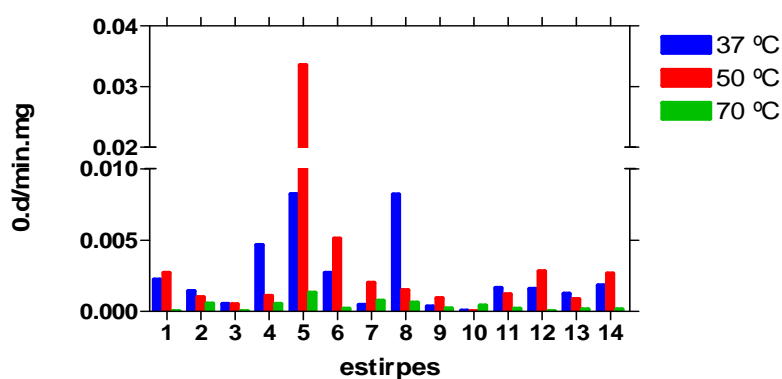
O método titrimétrico, também chamado de titulação potenciométrica, baseia-se na titulação alcalina dos iões de hidrogénio, aquando da formação do produto de hidrólise (Watanabe *et al.*, 1997).

#### 3.2.1 Proteases

As proteases existem em todos os organismos e correspondem a 1-5% do seu conteúdo genético. Encontram-se envolvidas numa grande variedade de reacções metabólicas, que vão desde a simples digestão de proteínas do alimento a cascatas altamente reguladas no organismo (Rawling & Barret, 1994a).

Possuem grande aplicabilidade em várias indústrias que vão desde a indústria alimentar até a indústria farmacêutica, sendo o grupo de enzimas mais comercializadas no mundo (Alvarez-sanchez *et al.*, 2000; Forgati & Kelly, 1990).

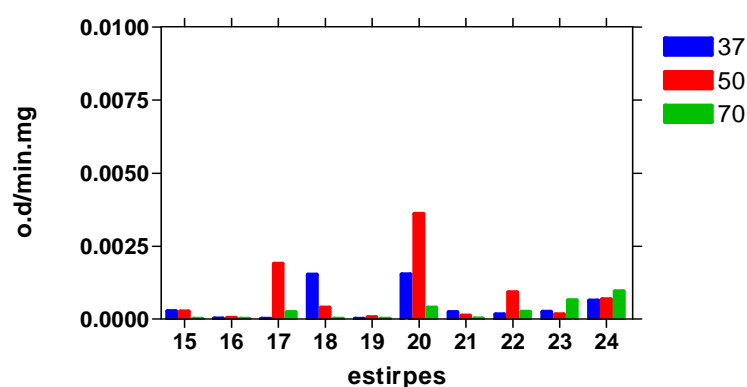
A actividade proteolítica extracelular, dos isolados, foi quantificada por digestão de caseínas a várias temperaturas. Os resultados são expressos em função do peso seco do micélio.



**Fig. 20:** Gráfico da actividade proteolítica extracelular dos isolados pertencentes ao género *Neofusicoccum*.

Podemos observar que alguns isolados possuem uma actividade proteolítica elevada (a 37°C e 50°C). É o caso do isolado 5 (*N. parvum*) (figura 20), que possui actividade significativamente mais alta que os restantes isolados tanto a 37 como a 50°C, mas também do isolado 8 (*N. mediterraneum*) que possui grande actividade a 37°C. Os restantes isolados também possuem actividade proteolítica, sendo de notar que à temperatura de 50°C regista-se maior actividade para a grande maioria dos isolados

É de notar que vários isolados produzem proteases activas a 70°C.



**Fig. 21:** Gráfico relativo à actividade proteolítica dos isolados pertencentes ao género *Dothiorella*.

É possível observar que, em geral, as enzimas proteolíticas produzidas pelos isolados do género *Dothiorella* possuem uma baixa actividade proteolítica (figura 21). A máxima actividade foi obtida pelo isolado 20 (*Do. viticola*) com uma actividade de 0,0030 o.d.min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup>, a 50°C. Assim, comparando com os isolados do género *Neofusicoccum*, os isolados de *Dothiorella* mostraram produzir enzimas extracelulares com actividades proteolíticas baixas, aparentemente não relevantes em termos de potencial biotecnológico.

Na figura 22 verifica-se, assim como o constatado para os isolados do género *Dothiorella*, que em geral os isolados do género *Diplodia* apresentam baixa actividade proteolítica. Verifica-se ainda que as enzimas extracelulares produzidas pelo isolado 32 (*D. cupressi*) exibem maior actividade proteolítica a 70°C que às restantes temperaturas testadas.



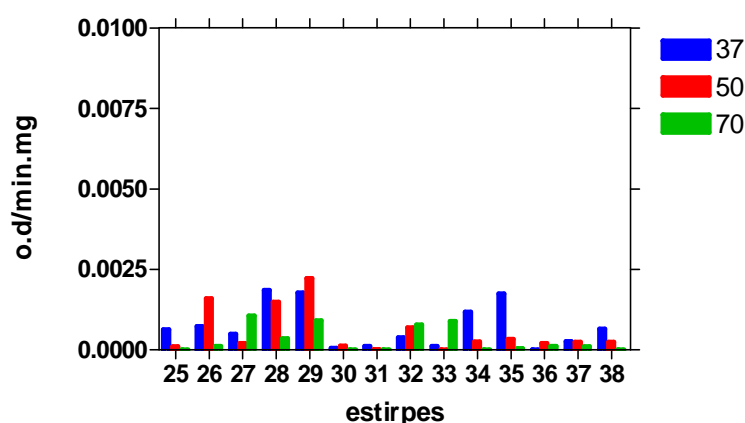


Fig. 22: Gráfico relativo à actividade proteolítica dos isolados pertencentes ao género *Diplodia*.

É de notar que o isolado 45 (*B. corticis*; figura 23) apresenta enzimas extracelulares activas a 37°C e a 70°C (sendo este grupo de enzimas o que possui maior actividade). Um padrão de actividade semelhante foi obtido pelo isolado 42 (*B. melanops*) cujas proteases extracelulares não possuem actividade a 37°C mas apresentam maior valor de actividade proteolítica a 70°C.

Verifica-se ainda que as proteases produzidas pelo isolado 43 (*B. melanops*) exibem maior actividade proteolítica a 70°C que às restantes temperaturas analisadas.

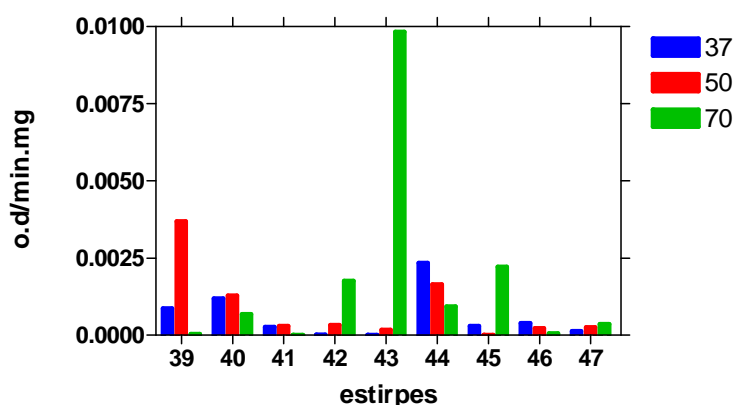
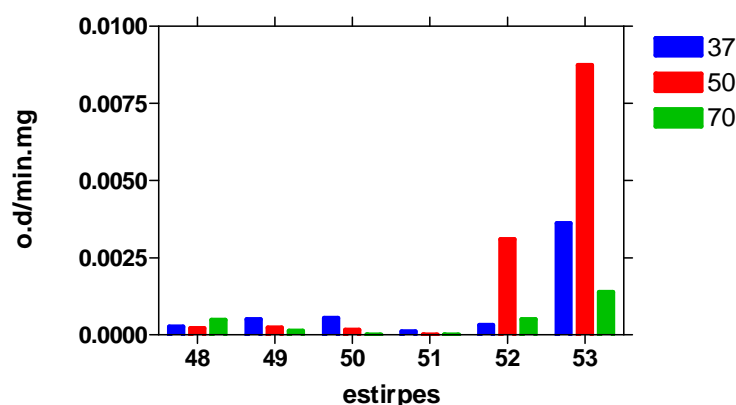


Fig. 23: Gráfico relativo à actividade proteolítica dos isolados pertencentes ao género *Botryosphaeria*.



**Fig. 24:** Gráfico relativo à actividade proteolítica de isolados pertencentes ao género *Lasiodiplodia*

No género *Lasiodiplodia* (figura 24), apenas os isolados 52 (*L. pseudotheobromae*) e 53 (*L. pseudotheobromae*) apresentam enzimas extracelulares com um valor de actividade enzimática de relevo, sendo, mais uma vez, o maior valor de actividade obtido a 50°C. No entanto é de notar que, a 70°C, possuem uma actividade não desprezável, face a outros géneros aqui estudados, como o género *Diplodia* (figura 22).

Podemos observar que os isolados do género *Neofusicoccum* produzem proteases com maior actividade enzimática, seguindo-se os isolados do género *Botryosphaeria*. O género que apresenta isolados com menor produção de enzimas proteolítica mostrou ser o género *Diplodia*.

Os resultados obtidos, no que diz respeito à estabilidade térmica, estão de acordo com o trabalho de Merheb e co-autores (2007), que demonstram que as proteases mantêm a sua estabilidade até temperaturas acima dos 50°C. Trabalhos anteriores, nomeadamente de Maheshwari e co-autores (2000) e Tunga e co-autores (2003), demonstram que fungos filamentosos (*Aspergillus parasiticus* e *Penicillium* sp.) conseguem manter a sua estabilidade térmica até 100% a temperaturas elevadas, mantendo enzimaticamente activas proteases.

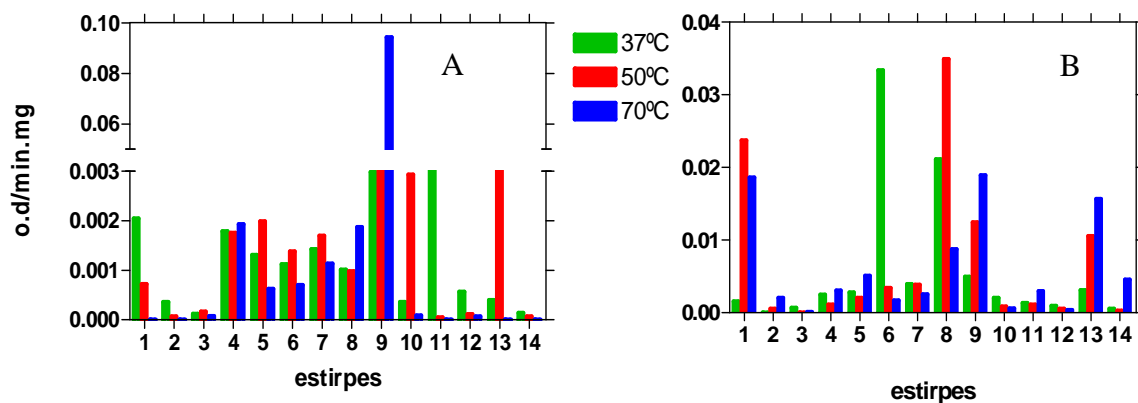
O papel das proteases no processo de infecção por fungos fitopatogénicos ainda não se encontra claramente definido. No entanto, embora numa primeira fase de infecção, as proteases não tenham uma participação activa no processo de infecção, uma vez dentro do hospedeiro estas poderão ser utilizadas para degradar as proteínas da matriz extracelular do hospedeiro de modo a melhor se difundir na planta ou até mesmo para se alimentar desta (Slippers & Wingfield, 2007).

A nível biotecnológico as proteases constituem um dos grupos de enzimas mais utilizadas quer na indústria alimentar (fabrico de queijos, rações de animais (aumentando a digestibilidade), fabrico de bebidas, entre outros) (Frokjaer, 1994; Beynon & Bond, 2001), na indústria farmacêutica são usadas em pomadas cicatrizantes e têm um uso potencial para outros medicamentos (Rao *et al.*, 1998) e na indústria de detergentes como aditivos (Maurer, 2004). Assim, tornam-se interessantes do ponto de vista biotecnológico, estirpes que produzam grandes quantidades de enzima a um menor custo possível.

### 3.2.2 Celulases

As celulases extracelulares produzidas por fungos são capazes de degradar a celulose, maior componente da parede celular vegetal. A celulose é considerada o mais importante reservatório de carbono que poderá ser convertido em glicose, sendo posteriormente utilizado na produção em etanol, ácidos orgânicos, biodiesel, entre outros compostos químicos (Delmer, 2002).

A nível biotecnológico, estas enzimas têm sido estudadas a nível de especificidade e actividade no controlo de pragas agrícolas (insectos e nemátodes) (Pereira *et al.*, 2007).

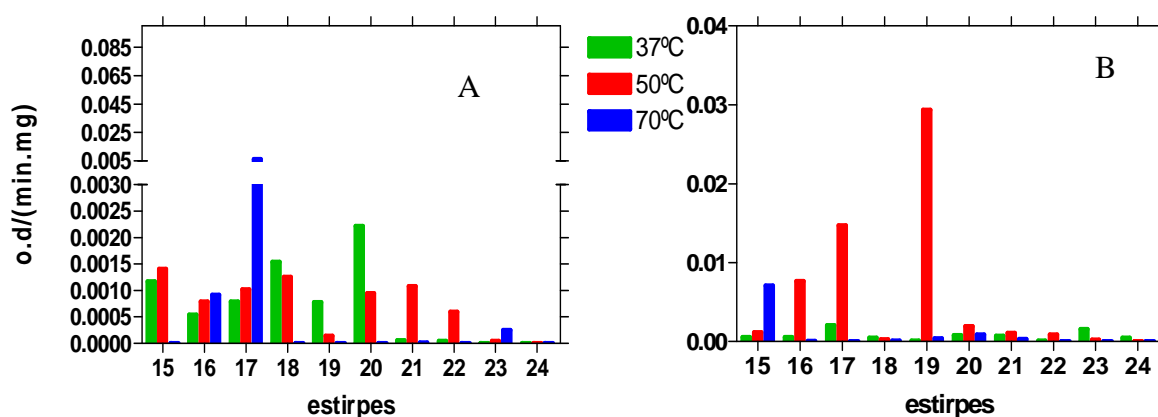


**Fig. 25:** Actividade celulolítica de isolados pertencentes ao género *Neofusicoccum*. A- actividade total; B- actividade endoglucanase

A actividade celulolítica extracelular dos isolados foi quantificada por digestão de carboximetilcelulose (CMC), que permite quantificar a actividade de endoglucanases, e papel de filtro (PF), que permite quantificar a actividade celulolítica total, a várias temperaturas, de acordo com o descrito por Dekker e colaboradores (2001). Os resultados são expressos em função do peso seco do micélio.

Podemos observar que alguns isolados possuem uma actividade celulolítica elevada (37°C e 50°C) quando comparados com os restantes isolados do mesmo género. O isolado 9 (*N. mediterraneum*) apresenta actividade significativa a 70°C, tanto em termos de actividade celulolítica total (figura 25.A) como também de actividade de endoglucanase (figura 25.B). É visível também uma alta actividade endoglucanase do isolado 6 (*N. australe*). De uma forma geral todos os isolados apresentam maior valor de actividade celulolítica total a 50°C.

A temperatura óptima de actividade das endoglucanases, neste género, não está bem clara, existindo actividade enzimática em todas as temperaturas.



**Fig. 26:** Actividade celulolítica de isolados pertencentes ao género *Dothiorella*. A- actividade total; B- actividade endoglucanase.

Os isolados pertencentes ao género *Dothiorella*, apresentam de uma forma geral maior actividade aos 50°C, como se pode verificar pela figura 26. Contudo, o isolado 17 (*Dothiorella* sp.) apresenta actividade celulolítica extracelular total (figura 26.A), significativa a 70°C. Tal como foi verificado nos isolados do género *Neofusicoccum* (figura 26), também estes isolados apresentam uma produção pouco relevante de endoglucanases (figura 26.B) com excepção do isolado 19 (*Dothiorella* sp.) que demonstra produzir endoglucanases com actividade a 50°C de uma forma relevante.

Os isolados pertencentes ao género *Diplodia* (figura 27) apresentam enzimas com actividade mais elevada a 50°C. No entanto, existem isolados que não apresentam actividade celulolítica total, como é o caso do isolado 26 (*D. seriata*). A actividade celulolítica de endoglucanases do isolado 38 (*D. scrobiculata*) a 70°C e a elevada actividade do isolado 26 (*D. seriata*) a 50°C são de relevância. De uma forma geral, os

isolados pertencentes a este género possuem baixa actividade celulolítica quando comparadas com a actividade do género *Neofusicoccum* (figura 25).

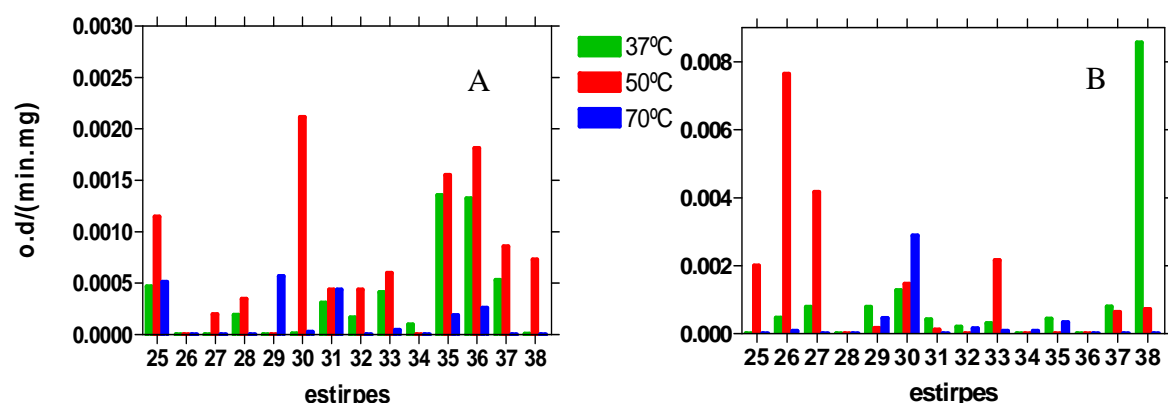


Fig. 27: Actividade celulolítica dos isolados pertencentes ao género *Diplodia*. A- actividade total; B- actividade endoglucanase.

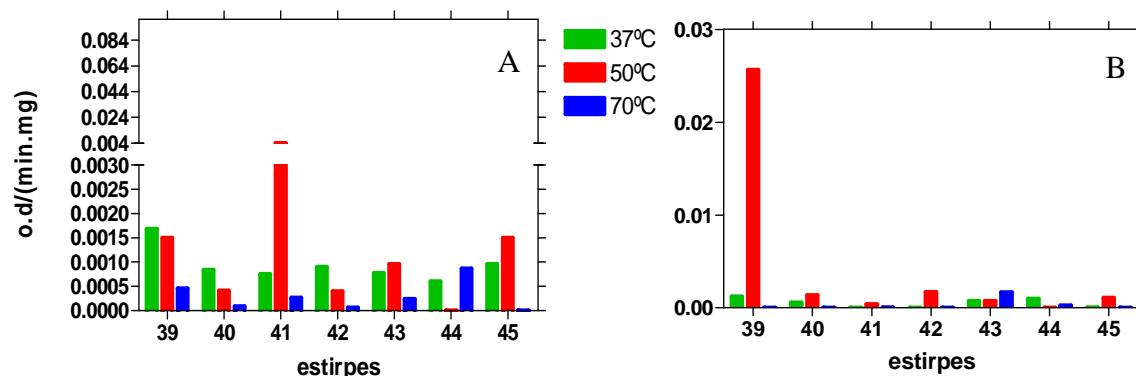
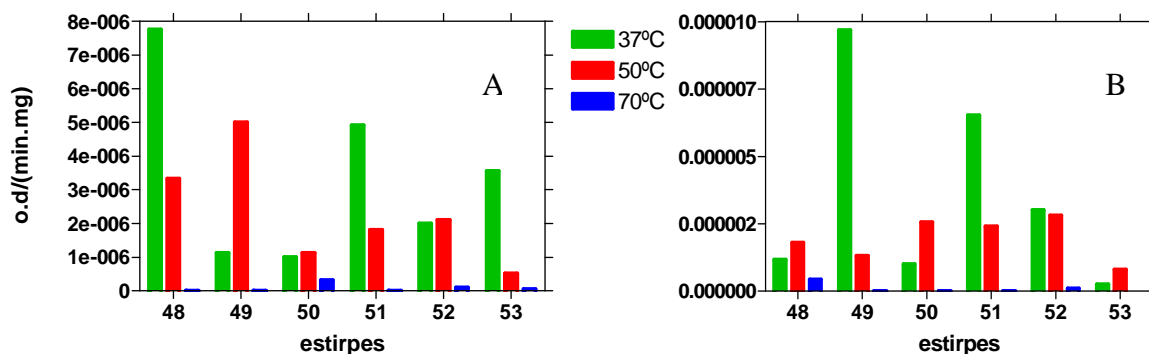


Fig. 28: Actividade celulolítica de isolados pertencentes ao género *Botryosphaeria*. A- actividade total; B- actividade endoglucanase

Os isolados pertencentes ao género *Botryosphaeria* (figura 28) produzem celulasas extracelulares cuja actividade enzimática se verifica a 50°C, pelo isolado 41 (*B. dothidea*). No entanto, observam-se isolados com actividade a 70°C. A actividade das endoglucanases é, em geral, de pouca relevância neste género ressaltando-se o isolado 39 (*B. dothidea*), que possui um valor de actividade aproximadamente 2 vezes mais alto que o dos restantes isolados a 50°C.

Ao contrário do obtido com os isolados dos géneros descritos anteriormente, os isolados pertencentes ao género *Lasiodiplodia* (gráfico 29) apresentam enzimas extracelulares cujo

maior valor de actividade foi obtido a 37°C. Estes isolados, de uma forma geral, apresentam pouca actividade celulolítica total.



**Fig. 29:** Actividade celulolítica de isolados pertencentes ao género *Lasiodiplodia*. A- actividade total; B- actividade endoglucanase

A capacidade de degradar celulose é uma característica inerente a organismos como bactérias e fungos. Os fungos produtores de celulasas mais estudados são: *Trichoderma* sp. (Mandels & Reese, 1985), *Penicillium* sp., *Sporotrichium* sp. e *Aspergillus* sp. (Kazuhi, 1997).

A fonte de carbono induz a produção de celulasas, no entanto, a quantidade produzida é variável, devido à influência do substrato utilizado no crescimento do organismo. Neste trabalho foram utilizados dois substratos PF e CMC, para além disso factores ambientais tais como a temperatura, pH e concentração de sais podem influenciar a produção de enzimas (Immanuel *et al.*, 2006). Neste trabalho foi analisada a influência da temperatura na produção de celulasas e chegou-se, tal como Dekker e co-autores (2001) e Kim e co-autores (2009) que a temperatura óptima para hidrólise de CMC e PF situa-se a 50°C.

Seria de esperar elevadas actividades celulolíticas por parte de fungos fitopatogénicos, já que estes necessitam destas para degradar a parede celular das plantas (incluindo as plantas vasculares, os musgos e as algas verdes) que é formada essencialmente por microfibrilhas de celulose (Zhou *et al.*, 2008), e para assim poderem penetrar na planta. No entanto, este trabalho demonstra que, pelo menos nestes géneros analisados, nem sempre esse conceito se aplica.

Os resultados obtidos neste trabalho não reflectem os resultados obtidos por Pointing e colaboradores (1999) no sentido de que, em regra, neste trabalho o valor de actividade total foi menor que o valor de actividade de endoglucanases. Pointing e colaboradores (1999)

afirmam que existe uma maior actividade em meios contendo PF, uma vez que o PF se assemelhará mais à celulose existente na natureza. O facto da actividade total ser menor que actividade de endoglucanases, aparentemente, não faz sentido, uma vez que, a actividade total engloba a actividade de exo e endoglucanases, esta deveria ter um valor maior que o valor de actividade de endoglucanase apenas. No entanto, e apesar dos substratos se encontrarem sob formulações diferentes (CMC em pó e PF não triturado) eles possuem a mesma massa (20mg), pode influenciar o mecanismo de encaixe (enzima/substrato), influenciando assim o valor de actividade celulolítica.

No que diz respeito aos valores obtidos de actividade, podemos dizer que o género *Lasiodiplodia* possui isolados com enzimas menos activas face aos restantes géneros analisados.

O facto destes isolados possuírem enzimas activas à temperatura de 70°C ainda não se encontra esclarecido, uma vez que estes fungos são fitopatogénicos ocorrendo na natureza a temperaturas não acima dos 40°C, não existindo, aparentemente, necessidade de possuir enzimas activas a temperaturas mais elevadas.

O grande impedimento à exploração comercial de celulases reside no facto da pouca estabilidade e, ainda, elevado custo de produção (Coral *et al.*, 2002). Os resíduos florestais e agrícolas têm sido utilizados na produção de celulases (Chalal, 1996), no sentido de minimizar os custos e reciclar matéria-prima.

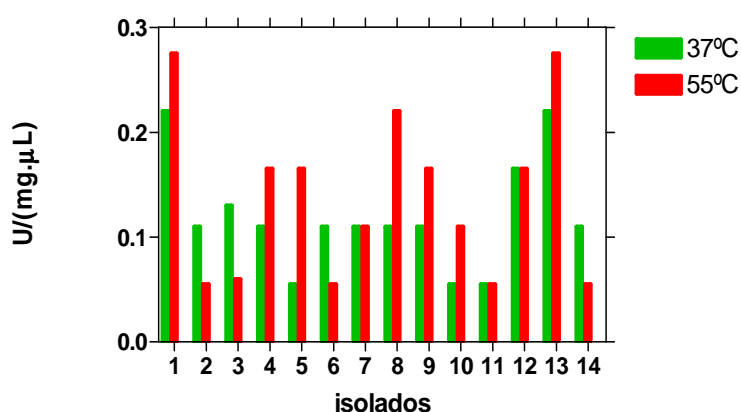
A produção de celulases representa 40% do custo de produção de bioetanol. Para colmatar esses custos, são utilizados substratos lenhicolíticos ao invés de celulases comerciais, uma vez que o seu custo é mais baixo e apresenta maior capacidade de produção enzimática. Assim, podemos, para além de, reciclar produtos lenhicolíticos, prevenir a poluição ambiental.

### **3.2.3 Lipases**

A actividade lipolítica pode ser determinada utilizando diversos substratos (azeite, óleos vegetais, tween, entre outros) emulsionados ou não, com diferentes valores de pH e diferentes tempos (Jaeger & Reetz, 1998).

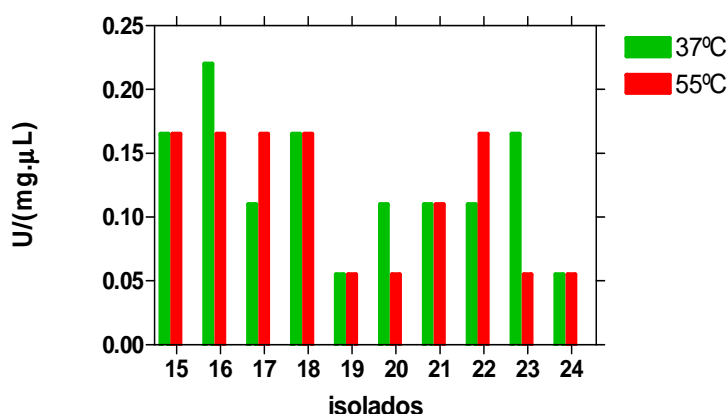
Em biotecnologia as lipases são enzimas muito utilizadas com diversas finalidades, que vão desde a indústria alimentar [rações, panificação (Van Der Maarel *et al.*, 2002)] até à cosmética [cremes e produtos de higiene (Sharma *et al.*, 2001; Jaeger & Reetz, 1998)].

A actividade lipolítica extracelular, dos isolados, foi quantificada por hidrólise do azeite, emulsionado com trietanolamina, a várias temperaturas. Todos os resultados são expressos em função do peso seco do micélio.



**Fig. 30:** Actividade lipolítica de isolados pertencentes ao género *Neofusicoccum*

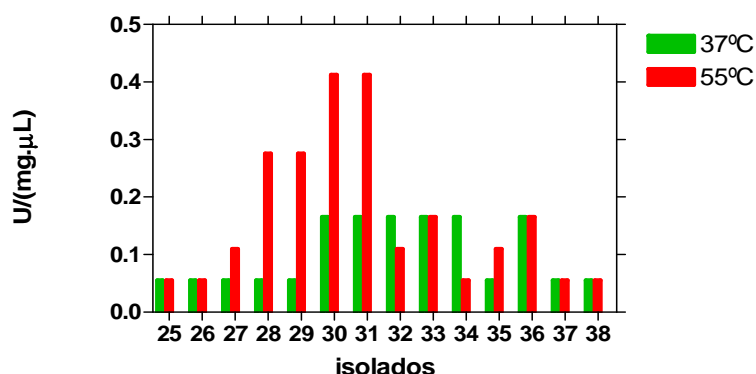
Podemos observar os valores para a actividade lipolítica das estirpes pertencentes ao género *Neofusicoccum* a 37°C e 55°C (figura 30), existindo maior actividade lipolítica a 55°C, tendo como valor máximo  $0,275 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \mu\text{L}^{-1}$



**Fig. 31:** Actividade lipolítica de isolados pertencentes ao género *Dothiorella*

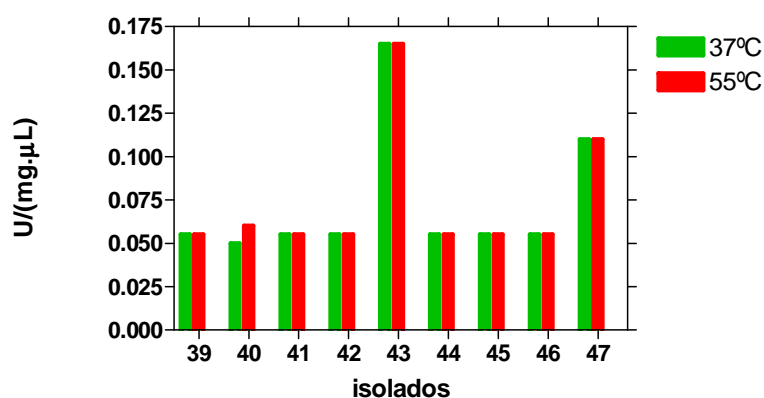


É interessante verificar que os isolados do género *Dothiorella* (figura 31) apresentam valores de actividade lipolítica extracelular semelhantes a ambas as temperaturas testadas. Estes isolados apresentam enzimas lipolíticas extracelulares com um valor de actividade enzimática de relevo, obtido a 37°C.



**Fig. 32:** Actividade lipolítica de isolados pertencentes ao género *Diplodia*

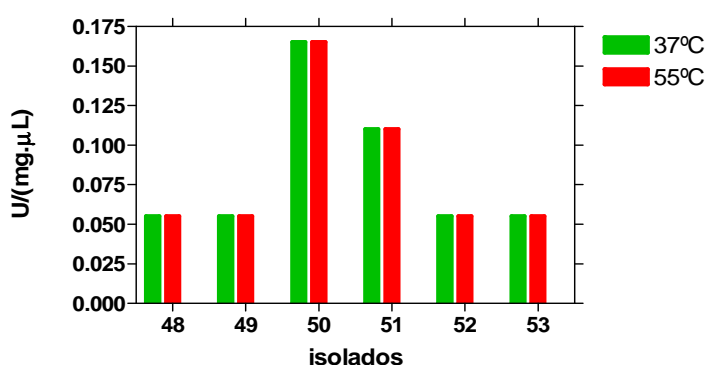
É possível observar que, em geral, a produção de enzimas lipolíticas pelos isolados do género *Diplodia* (figura 32) com maior expressão é, mais uma vez, a 55°C. Existindo em alguns isolados uma homogeneidade do valor de actividade nas diferentes temperaturas analisadas.



**Fig. 33:** Actividade lipolítica de isolados pertencentes ao género *Botryosphaeria*

No género *Botryosphaeria* (figura 33) a actividade lipolítica extracelular apresenta valores homogéneos para valores de temperatura distintos, o que poderá indicar uma estabilidade térmica elevada das mesmas ou a produção de várias enzimas cujas actividades se sobrepõem.

O género *Lasiodiplodia* (figura 34), quando comparado com os restantes géneros analisados apresenta menores valores de actividade lipolítica extracelular. Existe uma homogeneidade de valores de actividade nas duas temperaturas estudadas, o que, tal como o discutido relativamente aos isolados do género *Botryosphaeria* nos poderá indicar que este género possui uma estabilidade térmica elevada ou que existe produção de várias enzimas cujas actividades se sobrepõem.



**Fig. 34:** Actividade lipolítica das estirpes pertencentes ao género *Lasiodiplodia*

Os valores descritos na literatura são variáveis no que diz respeito às lipases em fungos. No entanto, para fungos da família *Botryosphaeriaceae* estão descritos valores acima de 2U/mL (Costa, 2007) utilizando como substrato lipídico o azeite.

Segundo Lima e co-autores (2004), uma forma geral, as lipases fúngicas não são estáveis a temperaturas acima dos 40°C. No entanto, Costa e co-autores (1999) fizeram um trabalho com *P. wortmanii* que revelou ser termoestável (conservou em 90 e 55% a actividade enzimática inicial) durante 60 min a temperaturas entre 45 e 50°C. Também Ibrick e co-autores (1998) com o seu trabalho demonstraram que lipases de *P. cyclopium* apresenta estabilidade a 37 °C, no entanto para temperaturas acima de 40°C é rapidamente degradada. Os resultados obtidos neste trabalho contradizem os resultados apresentados pelos autores acima citados, pois verifica-se actividade enzimática acima dos 50°C por uma grande maioria dos isolados estudados.

As inúmeras variáveis que envolvem o processo de produção de enzimas vão desde a composição do meio (fonte de carbono, fonte de azoto, sais e indutores) até a condições

operacionais como pH, temperatura, agitação e oxigenação. Um dos factores a ter em conta a quando da determinação da actividade lipolítica é a superfície de contacto emulsão/extracto enzimático, uma vez que estas enzimas actuam na interface água/óleo.

As lipases microbianas são amplamente utilizadas em biotecnologia, pois estas enzimas são capazes tanto de degradar como de sintetizar ligações ésteres de triacilgliceróis (Jaeger & Reetz, 1998).

Aparte da sua aplicação na biotecnologia, a cada dia que passa torna-se evidente que as lipases extracelulares são importantes factores de virulência microbianos. As investigações têm-se focado principalmente em bactérias patogénicas do Homem, tendo o papel das lipases fúngicas como factores de virulência, mais uma vez, sido negligenciado (Jaeger *et al.*, 1994).

O papel mais significativo das lipases extracelulares situa-se na digestão de lípidos para a obtenção de nutrientes. Também estas enzimas podem ajudar a fixação dos microrganismos a células (Miskin *et al.*, 1997). O que leva à hidrólise da membrana celular, libertando receptores e consequentemente à morte celular e proliferação do fungo (microrganismo).

Em termos biotecnológicos o género mais interessante será o *Neofusicoccum* pois apresenta valores de actividade maiores, comparativamente aos restantes géneros, bem como valores de actividade mais altos à temperatura de 55°C.

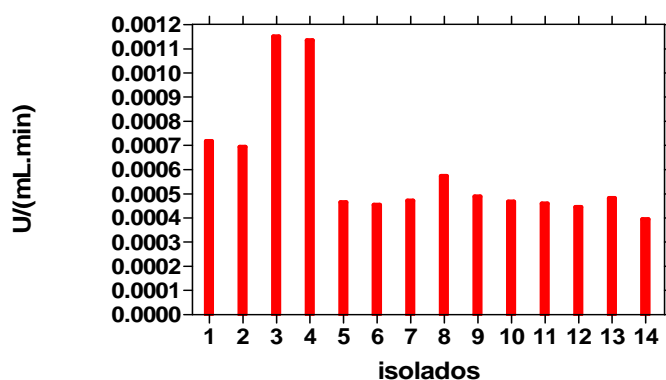
O método titrimétrico apresenta uma fraqueza na constatação do ponto de viragem. Há uma falta de consenso sobre o ponto exacto de viragem, principalmente na intensidade de cor, sendo variável de um operador a outro. Assim, existe a necessidade dos ensaios serem sempre realizados pelo mesmo operador, para que os valores sejam o mais correcto possível.

Com o mundo cada vez mais dependente de combustíveis, surge a necessidade de produzir combustíveis a partir de matérias-primas existentes em abundância no ambiente. Aqui as lipases têm um papel de importância fundamental a nível biotecnológico, pois através de um processo de transesterificação de óleos, onde as lipases participam activamente, é possível transformar óleos quer domésticos quer industriais em biodiesel. Este processo não só nos ajuda a manter um ambiente menos poluído como nos permite obter um combustível a partir de matéria-prima renovável.

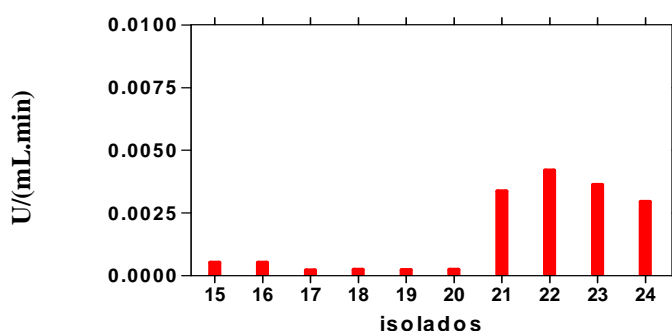
### 3.2.4 Lacases

As lacases têm sido utilizadas como cátodos em células de combustíveis catalisados enzimáticamente, sendo das poucas oxidoreduktases comercializadas como catalisadores industriais. Estas enzimas podem ser utilizadas na indústria têxtil, em branqueadores dentais, noutras aplicações industriais, na biorremediação, ambientais e de diagnóstico (Schneider *et al.* 1999, Durán *et al.* 2002).

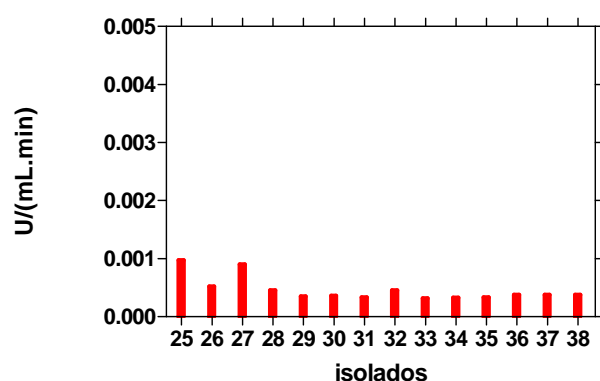
A actividade lenhinolítica extracelular, dos isolados, foi quantificada por hidrólise do 2,6-dimetoxifenol (DMP), a 50°C.



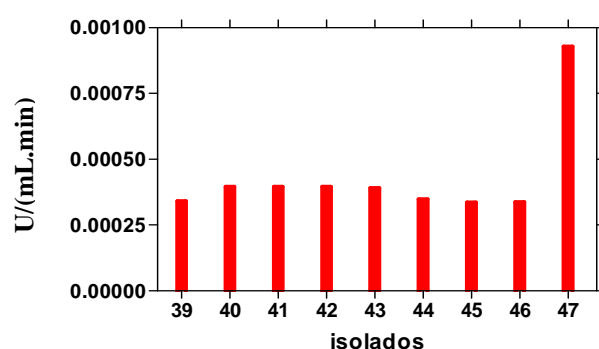
**Fig. 35:** Actividade lenhinolítica de isolados pertencentes ao género *Neofusicoccum*, utilizando como substrato o DMP.



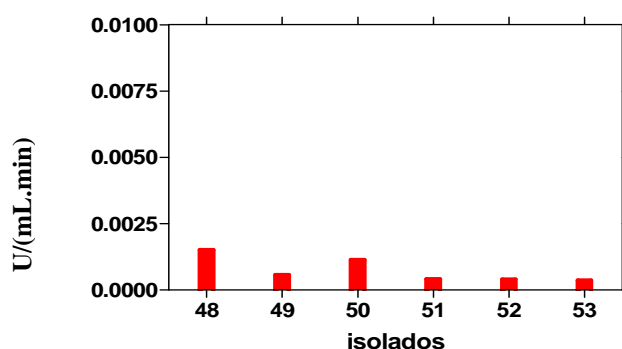
**Fig. 36:** Actividade lenhinolítica de isolados pertencentes ao género *Dothiorella*, utilizando como substrato DMP.



**Fig. 37:** Actividade linhinolítica de isolados pertencentes ao género *Diplodia*, utilizando como substrato DMP.



**Fig. 38:** Actividade linhinolítica de isolados pertencentes ao género *Botryosphaeria*, utilizando como substrato DMP



**Fig. 39:** Actividade linhinolítica de isolados pertencentes ao género *Lasiodiplodia*, utilizando como substrato DMP

A actividade enzimática da lacase dos isolados em estudo está representada nas figuras 35-39. Podemos observar que os isolados 21-24 (21 *Do. viticola*; 22-24 *Do. sarmentorum*; figura 36) apresentam maior actividade lenhinolítica quando comparado com os restantes isolados em estudo.

Cerca de uma centena de lacases de fungos causadores da podridão branca foram purificadas e analisadas por Baldrian (2006). Entre as lacases analisadas por este autor

verifica-se que, tendo como substrato o DMP as lacases exibem temperatura óptima de reacção entre 50 °C e 70 °C, sendo que em poucos casos as lacases apresentaram temperatura óptima abaixo de 45°C. Também segundo Dekker e co-autores (2002) a temperatura óptima para fungos fitopatogénicos do género *Botryosphaeria* é 45°C, o que vai de encontro com os resultados obtidos neste trabalho.

Dekker e colaboradores (2002) obtiveram valores de actividade linhinolítica abaixo de 0,005 U/mL para isolados de *Botryosphaeriaceae*, o que vai de encontro com os resultados obtidos neste trabalho.

As lacases julga-se que contribuam para a virulência do microrganismo através da síntese de melanina, aquisição de ferro e interfere com o processo oxidativo (Jacobson *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1999)

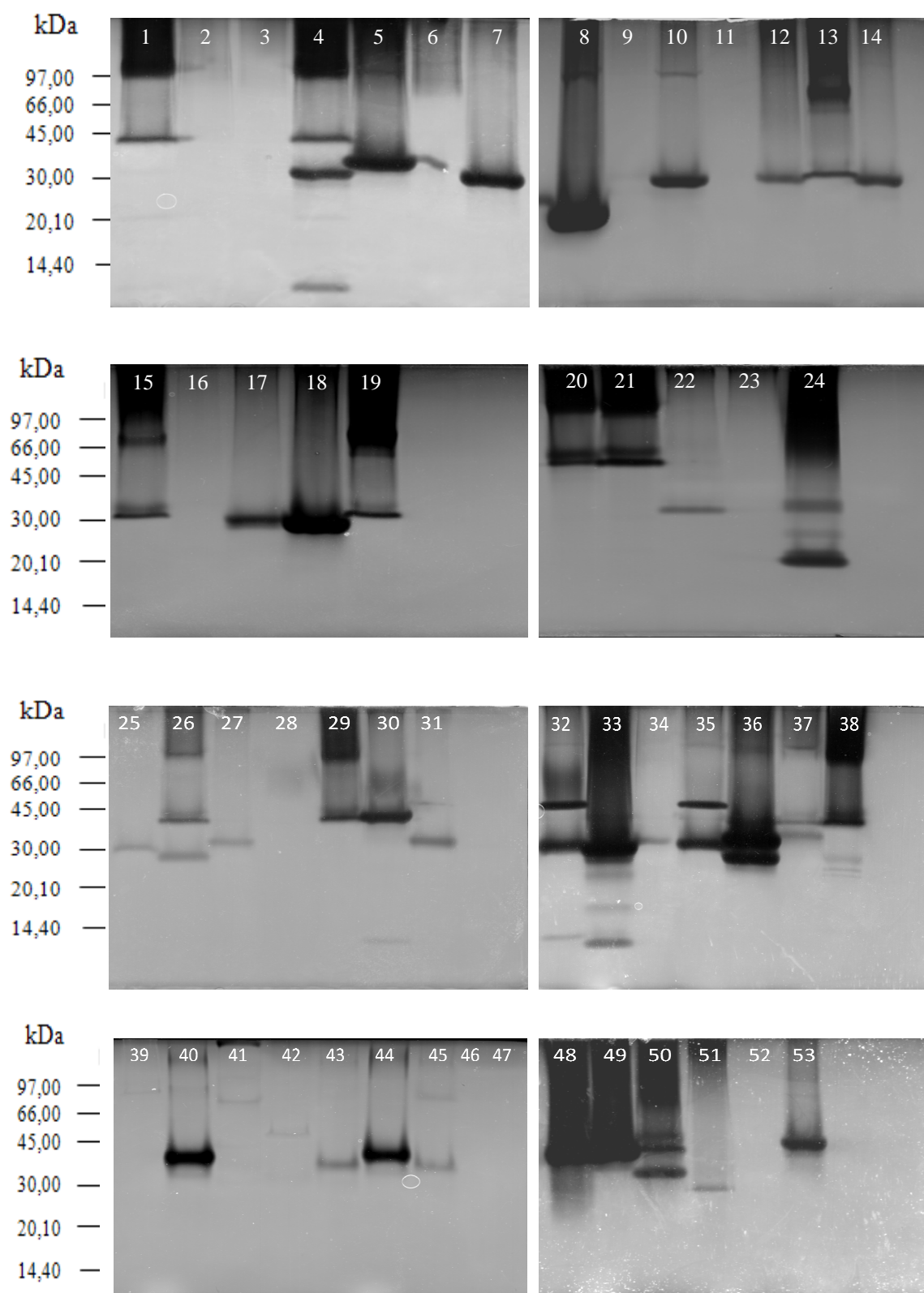
As lacases também estão associadas à degradação da parede celular através da quebra de ligações (Zhou, 2001).

### **3.3– Caracterização enzimática - proteases**

A electroforese é uma técnica de separação de moléculas de tamanhos diferentes por aplicação de um campo eléctrico. Quando este é aplicado a uma solução de proteínas, estas moléculas migram numa direcção e a uma velocidade que reflectem a sua massa molecular e carga global (Hames, 1981). A zimografia é uma electroforese com a incorporação de um substrato, permitindo verificar a mobilidade relativa e a actividade das mesmas.

Neste trabalho foi utilizado como substrato a gelatina, que permite detectar a actividade proteolítica dos extractos (mais especificamente, actividade gelatinolítica).

Podemos ver através da figura 40 que as gelatinases nas diferentes estirpes têm pesos moleculares diferentes, degradando o substrato (gelatina) em diferentes pontos de migração no gel. Existem isolados que não apresentam actividade gelatinolítica, como é o caso dos isolados 3, 11,16 e 52. No entanto, os resultados deste trabalho mostraram que este isolados são produtores de proteases extracelulares (figuras 20, 21 e 24). Assim, podemos concluir que estas proteases detectadas por hidrólise de caseínas não hidrolisam gelatina, não sendo, portanto, gelatinases.



**Fig. 40:** Zimografia (em géis de poliacrilamida com gelatina) de extractos de isolados crescidos em meio PDA líquido durante 14 dias à temperatura ambiente sem agitação. Os números nas figuras correspondem aos isolados em estudo (ver tabela 1)

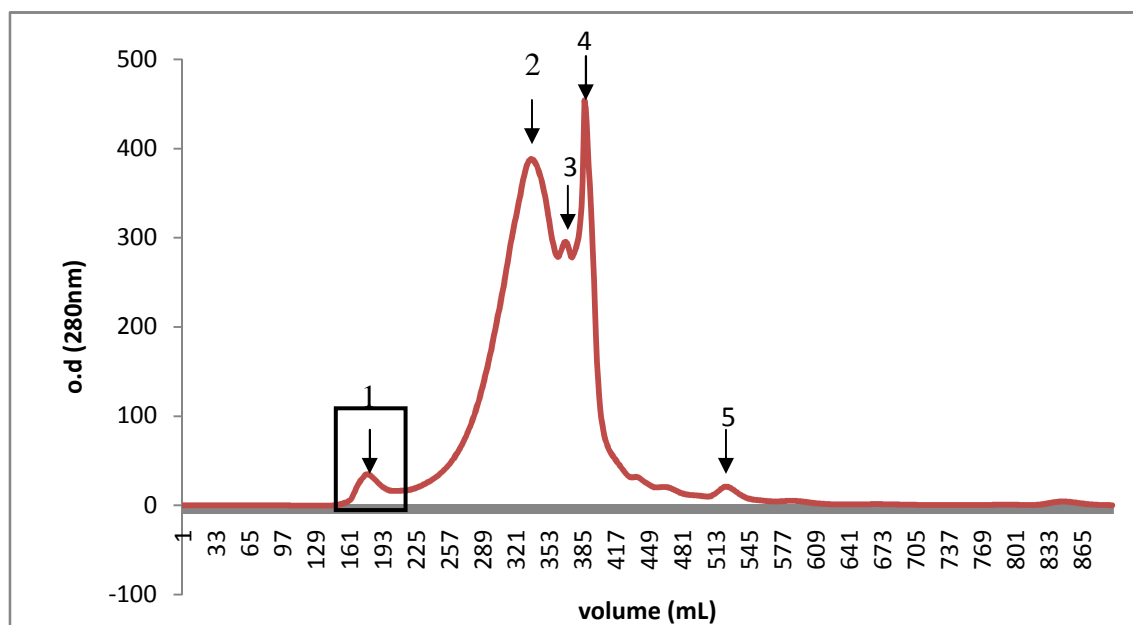
A presença de várias bandas num mesmo extracto pode ter várias interpretações: produção de enzimas diferentes ou produção da mesma enzima mas com conformações diferentes, o que origina diferentes pontos de migração no gel.

Podemos ver isolados diferentes com proteínas com igual perfil electroforético (caso dos isolados 12 e 14; 40 e 44), mas isso não significa que as proteínas sejam iguais, sendo necessário efectuar uma caracterização molecular e bioquímica mais aprofundada de todas as proteínas com o mesmo perfil.

### 3.4- Purificação parcial de enzimas

A cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua facilidade de efectuar a separação e a quantificação das espécies químicas, por si só ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise.

Nesta etapa do trabalho foi utilizado o extracto do isolado 5 espécie *N. parvum*, uma vez que aquando da determinação da actividade enzimática de protease esta estirpe apresentou valores elevados às temperaturas de 37°C e 50°C (figura 21).

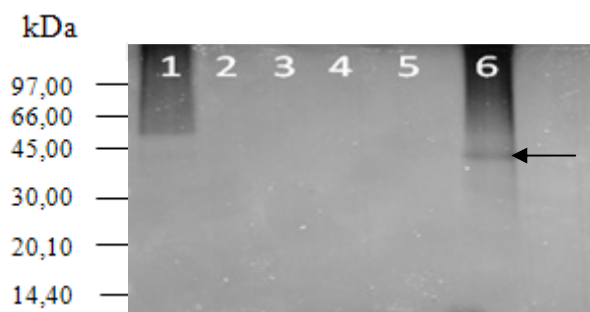


**Cromatograma 1:** Cromatograma obtido através de cromatografia de exclusão molecular com extracto da estirpe 5 (*N. parvum*)



Foram carregados 10mL de extracto (isolado 5 – *N. parvum*) no *loop*, posteriormente a amostra foi injectada na coluna dando início ao método. Durante o método cromatográfico (exclusão molecular) foram retiradas amostras de 1,5mL, posteriormente mantidas a 4°C.

A cromatografia de exclusão molecular do meio extracelular de *N. parvum*, permitiu obter um fraccionamento molecular (cromatograma 1). Através deste é possível observar a existência de 5 picos, assimétricos. A assimetria dos picos sugere que não estamos perante frações puras.



**Fig. 41:** Zimografia em gel de poliacrilamida com gelatina realizado com os picos assinalados no cromatograma e com o extracto do isolado 5; kDa- marcador de baixos pesos moleculares; 1-5 picos assinalados no cromatograma; 6- extracto enzimático

Após a cromatografia de exclusão molecular foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida, de modo a detectar as fracções com actividade proteolítica. Foi possível observar que apenas a fracção do pico 1 degradou o substrato. Deste modo, esta fracção corresponde à proteína com actividade proteolítica.

## *Capítulo 4 – Conclusões*

Pelos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que:

- I. O género *Neofusicoccum* é o género, em geral, que apresenta estirpes com maior actividade enzimática;
- II. O género *Lasiodiplodia* é o género que apresenta, em geral, isolados com menor actividade enzimática;
- III. Alguns isolados possuem enzimas activas a 70°C, o que se poderá revelar útil em termos biotecnológicos;
- IV. Das enzimas estudadas neste trabalho, a nível biotecnológico, será mais interessante explorar as proteases e lipases, pois a sua aplicabilidade na indústria é cada vez maior e a demanda mundial por estas duas enzimas é a cada dia mais elevada e também porque possuem um papel activo na patogenicidade de microrganismos.

## *Capítulo 5 – Perspectivas futuras*

Este trabalho de detecção e quantificação de enzimas de isolados da família *Botryosphaeriaceae*, não tinha como objectivo perceber a forma como estas proteínas actuam no processo de infecção desta família de fungos fitopatogénicos - *Botryosphaeriaceae*. No entanto, abre portas para que sejam feitos testes de citotoxicidade com as enzimas puras e assim, tentar, obter respostas, já que é reconhecido o papel de enzimas destas classes em mecanismos de fitopatogenicidade.

Sendo os fungos negligenciados em áreas como a resistência a fungicidas, e sendo estes isolados, também, fitopatogénicos, seria interessante analisar a sua resistência e de que forma as enzimas estudadas neste trabalho podem intervir nesse processo.

A obtenção e clonagem de genes para sobreexpressar algumas das enzimas estudadas, nomeadamente lipases, para aplicação na degradação de óleos usados e assim se obter biodiesel é uma linha de pesquisa interessante e com elevada aplicabilidade.

## *Capítulo 6 – Bibliografia*

Abbas H, Hiol A, Deyris V, Comeau L. 2002. Isolation and characterization of an extracellular lipase from *Mucor sp* strain isolated from palm fruit. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 968–975.

Aehle W. 2007. *Enzymes in industry* 3<sup>rd</sup> Edition: Wiley-VCH. 517 pp.

Alvarez-sanchez MEA, Avila-Gonzalez L, Becerril-Garcia C, Fattel-Facenda LF, Ortega-Lopes J, Arroyo R. 2000. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microbial pathogenesis* 28:193-202.

Alves AJCP. 2006. Espécies de *Botryosphaeria* em *Quercus* spp. e outros hospedeiros lenhosos: taxonomia e filogenia [Tese de doutoramento]. Universidade de Aveiro. Aveiro. Portugal.

Alves A, Phillips A, Henriques I, Correia A. 2007. Rapid differentiation of species of *Botryosphaeriaceae* by PCR fingerprinting. *Research in Microbiology* 158: 112e121.

Archer DB and Peberdy JF. 1997. The molecular biology of secreted enzyme production by fungi. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17: 273-306.

Bastida A, Sabuquillo P, Armisen P, Fernandez-Lafuente R, Huguet J, Guisán J M. 1998. A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol. Bioeng.* 58: 486-493.

Baldrian P. 2006. Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Letters.* 30:215-242.

Beynon RJ, Bond JS. 2001. *Proteolytic enzymes: A practical approach.* 2<sup>nd</sup> Edition Academic press. Oxford. 340pp.

Bhat MK. 2000. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 18:355–383.

Brown MA, Zhao Z, Mauk AG. 2002. Expression and characterization of a recombinant multi-copper oxidase: laccase IV from *Trametes versicolor*. *Inorganica Chimica Acta*. 331:232-238.

Buckley M. 2008. The fungal Kingdom- diverse and essential roles in earth's ecosystem. American Academy of Microbiology. 48pp.

Buléon A. *et al.*. 1998. Starch granules: structure and biosintesis. *Internacional Journal of Biological Macromolecules*. 23: 85-112.

Carlile M, Watkinson SC, Gooday GW. 2001. The fungi 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press. 601 pp.

Carvalho FMS, Leite JrRP, Veno B. 2003. Pathogenic characterization of *Colletotrichum spp.* associated with apple diseases in southern Brazil. *Fitopatol. Bras.* 25: 72-78.

Cazes J. 2005. Encyclopedia of chromatography. 2<sup>nd</sup> Edition. Taylor & Francis. 898pp.

Chanzy H, Henrissat B. 1985. Undirection degradation of Valonia cellulose microcrystals subjected to cellulase action. *FEBS Lett.* 184: 285 – 288.

Claus H. 2004. Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron*. 35: 93-96.

Colen G. 2006. Isolamento e selecção de fungos produtores de lipases. [Tese de Doutoramento]. Faculdade de Farmácia UFMG. Brasil.

Collins HC, Braga G, Bonato P. 2006. Fundamentos de Cromatografia. Unicamp. Brasil. 453pp.

Conte AJ, Teixeira AS, Fialho ET, Schoulten NA, Bertechini AG. 2003. Efeito da Fitase e Xilanase sobre o Desempenho e as Características Ósseas de frangos de Corte Alimentados com Dietas Contendo Farelo de Arroz. *R. Bras. Zootec.* 32(5): 1147-1156.



Costa B, Filho AFS, Messias JM, Resende I, Lima VMG, Dekker R, Barbosa AM. sem data. Seleção de linhagens de *Botryosphaeria* produtoras de lipases em óleos vegetais e glicerol. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

Castro H, Mendes A, Santos J. 2004. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. Quim. Nova. 27:146-156.

Costa M, Peralta R. 1999. Production of lipase by soil fungi and partial characterization of lipase from a selected strain (*Penicillium wortmanii*). J. Basic Microbiol. 39:11–15.

Chalal PS, Chalal DS, Le GBB. 1996. Production of cellulase in solid state fermentation of *Trichoderma reesei*. MCG80 on wheat straw. Appl. Biochem. Biotechnol. 57/58: 433-42.

Coral G, Arikan B, Unaldi MN, Guvenmens H. 2002. Some properties of crude carboxymethyl cellulase of *Aspergillus niger* Zio. Wild type strain. Turk. J. Biol. 26: 209 – 213.

Cox GM, Mukherjer J, Cole GT, Casadevalle A, Perfect JR. 2000. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. Infection and Immunity 68: 443-448.

Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Philips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald JZ. 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*. Studies in Mycology 55: 235–253.

Dekker RFH, Vasconcelos AD, Barbosa AM, Giese E, Paccola-Meirelles L. 2001. A new role for veratryl alcohol: regulation of synthesis of lignocellulose-degrading enzymes in the ligninolytic ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp.; influence of carbon source; Biotechnology Letters 23: 1987–1993.

Delmer DP, Haigler CH. 2002. The regulation of metabolic flux to cellulose, a major sink for carbon in plants. Metabolic Eng. 4:22–8.

Demain AL. 2006. From natural products discovery to commercialization: a success story. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 33:486-495.

Dominguez A, Costas M, Longo MA. 2003. A novel application of solid culture: production of lipases by *Y. lipolytica*. *Biotechnology Letters* 25:1225-1229.

Dua M, Singh A, Sethunathan N, Johri AK. 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl Microbiol Biotechnol* 59:143–152

Ducros V, Brzozowski AM, Wilson KS, Ostergaard P, Schneider P, Svendsen A, Davies GJ. 2001. The structure of laccase from *Coprinus cinereus* at 1.6 Å resolution: evidence for different type 2 Cu-depleted isoforms. *Acta Crystallogr* 57: 333-336.

Durán N, Rosa MA, D'Annibale A, Gianfreda L. 2002. Applications of Laccases and Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized on Different Supports: A Review. *Enzyme and Microbial Technology* 31(7): 907-931.

Engel PC. 1999. *Enzymology*. Academic Press. UK. 289pp.

Enguita FJ, Martins LO, Henriques AO, Carrondo MA. 2003. Crystal Structure of a Bacterial Endospore Coat Component. A Laccase with enhanced thermostability properties. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (21): 19416-19425.

Fernandez-Acero F, Carbu M, Garrido C, Vallejo I, Cantoral JM. 2007. Proteomic Advances in Phytopathogenic Fungi. *Current Proteomics* 4 (2):79-88.

Forgati W M, Kelly CT. 1990. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. 2<sup>nd</sup> edition. Springer. 472 pp.

Fujinawa SBG, Dela TP. 1990. Application of acid urease to reduction of urea in commercial wines. *Am. J. Enol. Viticul.* 42: 350-354.

Frokfaer S. 1994. Use of hydrolysates for protein supplementation. Food technology 10: 86-88.

Gallo LA. 2006. Enzimas. USP-Universidade de São Paulo.

Glazer AN, Nikaido H. 2007. Microbial Biotechnology – Fundamentals of applied microbiology. 2<sup>nd</sup> Edition. Cambridge University Press. 577pp.

Gordon DB. 1995. Principles and Techniques in Practical Biochemistry. K. Wilson & J. Walker Eds. Cambridge University Press. Cambridge.

Gow NAR, Gadd GM. 1996. The growing fungus. Chapman & Hall. 480pp.

Gummadi SN, Panda T. 2003. Process Biochem. 38:987.

Gupta R, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. 2003. Microbial  $\alpha$ -Amylases: Biotechnological Perspective. Process Biochemistry p 1.

Gutiérrez A, Prieto A, Martínez AT. 1996. Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*. Carbohydrate Research 281: 143-154.

Hayashi K, Inoue Y, Shiga M, Sato S, Takano R, Hirayae K, Hibi T, Hara S, Pectinolytic enzymes from *Pseudomonas marginalis* MAFF 03-01173. Phytochemistry 45:1359-1363.

Hankin L, Anagnostakis SL. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia. 67:597-607.

Hamaa S, Yamajib H, Fukumizub T, Numatab T, Tamalampudia S, Kondob A, Nodac H, Fukudaa H. 2007. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. Biochemical Engineering Journal 34:273–278.

Hames BD, Rickwood D. 1981. Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach. Oxford: IRL Press.

Heikinheimo L. 2002. *Trichoderma reesei* cellulases in processing of cotton [Tese de doutoramento]. VTT Publications 483.Espoo. Finlândia.

Ibrick A, Chahinian H, Rugani N, Sarda L, Comeau LC. 1998. Biochemical and structural characterization of triacylglycerol lipase from *Penicillium cyclopium*. Lipids 33:377–384.

Immanuel G, Dhanusa R, Prema P, Palavesam A. 2006. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment. Int. J. Environ.Sci.Tech. 3 (1): 25-34.

Irwin D, Spezio M, Walker L, Wilson D. 1993. Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism and binding domain efforts. Biotechnol. Bioeng. 42:1002 – 1013.

Jacobson ES, Hong JD. 1997. Redox buffering by melanin and Fe(II) in *Cryptococcus neoformans*. J. Bacteriol. 179:5340-534.

Jaeger KE, Ransac S, Dijkstra BW, Colson C, Heuvel M, Misset O. 1994. Bacterial lipases. FEMS Microbial. Rev. 15:29-63.

Jaeger KE, Reetz M. 1998. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. Tibtech. 16:396-403.

Kahraman SS, Gurdal IH. 2002. Effect of synthetic and natural culture media on laccase production by white rot fungi. Bioresource Technology 82: 215-217.

Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. 2007. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. Bioresource Technology 77: 215±227.

Kazuhisa M. 1997. Renewable biological system for alternative sustainable energy production. (FAO-Agricultural Services Bulletin, 128). Osaka University. Japan.

Kembhavi AA, Kulkarni A, Panti A. 1993. Salt-tolerant and thermostable alkaline protease from *Bacillus subtilis* NCIM No. 64. Applied Biochemistry Biotechnology 38: 83–92.

Kim B, Lee B, Lee Y, Jin I, Chung C, Lee J. 2009. Purification and characterization of carboxymethylcellulase isolated from a marine bacterium, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53. Enzyme and Microbial Technology 44: 411–416.

Klonowska A, Gaudin C, Fournel A, Asso M, Petit JL, Giorgi M, Tron T. 2002. Characterization of a low redox potential laccase from the basidiomycete C30. European Journal of Biochemistry 269: 6119-6125.

Kuhad RC, Singh A, Eriksson K.. 1997. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls in biotechnology in pulp and paper industry. Scheper. T.Springer.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680–685.

Leitner C, Hess J, Galhaup C, Ludwig R, Nidetzky B, Kulbe KD, Haltrich D. 2002. Purification and characterization of a laccase from the white-rot fungus *Trametes multicolor*. Applied Biochemistry and Biotechnology (98-100):497-507.

Lima N, Mota M. 2005. Biotecnologia: Fundamentos e aplicações. Lidel. 528pp.

Lima VMG, Krieger N, Mitchell DA, Fontana JD. 2004. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. Biochemical Engineering Journal 18: 65-71.

- Liu L, Tewari RP, Williamson PR. 1999. Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 67:6034-6039.
- Lubbers MW, Rodriguez SB, Honey NK, Thornton RJ. 1996. Purification and characterization of urease from *Schizo-saccharomyces pombe*. *Can. J. Microbiol.* 42: 132-140.
- Mackay EM, Pateman JA. 1980. Nickel requirement of a urease-deficient mutant in *Aspergillus nidulans*. *J. Gen. Microbiol.* 116: 249-251.
- Malhotra K, Sharma P, Capalash N. 2004. Copper and dyes enhance laccase production in  $\gamma$ -proteobacterium *JB*. *Biotechnology Letters* 26: 1047–1050.
- Mandels M, Reese ET. 1985. Fungal cellulase and microbial decomposition of cellulosic fibres. *Dev. Ind. Microbiol.* 5: 5 – 20.
- Mansfield P. 2004. *Botryosphaeria* canker and brunch rot. Viti-Notes. [www.crcv.com.au](http://www.crcv.com.au) acedido a 10 Junho 2008.
- Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK. 2000. Thermophilic Fungi: their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 3: 461–488.
- Martinelle M, Holmquist M, Hult K. 1995. On the interfacial activation of *Candida* lipase A and B as compared with *Humicola* lipase. *Biochim. Biophys. Acta* 1258: 272-276.
- Maurer K. 2004. Detergent proteases. *Current Opinion in Biotechnology* 15:330–334.
- Mayer AM, Staples RC. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60 (6): 551-565.
- Melo E. 2007. Animal transgenesis: State of the art and applications. *Journal of Applied Genetics* 48: 47-61.

- Messina L. 2000. Biotechnology. Wilson, H.W.186pp.
- Miskin J, Farrell A, Cunliffe W, Holland K. 1997. Microbiology 143: 1745.
- Montesinos JL, *et al.* 1996. Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*. Applied Biochemistry and Biotechnology 59:25-37.
- Moraes LMP. 2004. Amilases. In: SAID, S.; PIETRO, R. Enzimas como agentes Biotecnológicos. Ribeirão Preto: Legis Summa.
- Mougin C, Jolival C, Briozzo P, Madzak C. 2003. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. Environmental Chemistry Letters 1: 145-148.
- Nidetzky B, Hayn M, Macarrón R, Steiner W. 1993. Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degrading different celluloses. Biotechnol. Lett. 15: (1): 71– 76.
- Oliveira DTM. 2000. Lipase extracelular de fungo filamentoso: isolamento e caracterização parciais. Belo Horizonte. Faculdade de Farmácia da UFMG.146pp.
- Olson GR, Woese CR, Overbeek R. 1994. The wins of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. J. Bacteriol. 176: 1-6.
- Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Singh D, Mohar R. 2000. Advances in microbial amylases. Biotechnology and Applied Biochem. 35: 1153-1169.
- Pandey A. 2004. Concise Encyclopedia of Bioresource Technology. Haworth Press. 735pp.
- Papagianne M. 2004. Fungal morphology and metabolic production in submerged processes. Biotechnol. Adv. 22: 189-259.
- Pavlic D, Slippers B, Coutinho TA, Wingfield MJ. 2009. Multiplegene genealogies and phenotypic data reveal cryptic species of the *Botriosphaeriaceae*: A case study on the

*Neofusicoccum parvum* / *N. ribis* complex. Molecular phylogenetics and Evolution. article in press.

Pereira JL, Noronha EF, Miller RNG, Franco O.L. 2007. Novel insights in the use of hydrolytic enzymes secreted by fungi with biotechnological potential. Letters in App. Microbiology 44: 573-581.

Phillips A. 2000. Excoriose, cane blight and related diseases of grapevines: a taxonomic review of the pathogens. Phytopathol. Mediterr. 39: 341–356.

Phillips A. 2002. *Botryosphaeria* species associated with diseases of grapevines in Portugal - Review. Phytopathol. Mediterr. 41: 3-18.

Poetz RC, Zentmyer GG, Nishijima WT, Rohrbach KG, Ohr HD. 1994. Compendium of Tropical Fruit Diseases. St. Paul. Aps Press. 88 P.

Pointing SB, Buswell JA, Jones EBG, Vrijmoed LLP. 1999. Extracellular cellulolytic enzyme profiles of five lignicolous mangrove fungi. Mycol. Res. 103(6): 696-700.

Rao MB, Tanksale AP, Ghatge MS, Deshpande VV. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, microbiology and molecular biology reviews. 62(3):597-635.

Rawling ND, Barret A. 1994. Families of serine peptidases. Meth. Enzymol 244:18-61.

Rawling ND, Barret A. 1994a. Families of cysteine peptidases. Meth. Enzymol 244:461-486.

Sanhueza RMV. sem data. Doenças de importância potencial para os pequenos frutos no sul do Brasil. EMBRAPA Uva e Vinho.



- Saran S, Isar J, Saxena RK. 2007. A modified method for the detection of microbial proteases on agar plates using tannic acid. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 697–699.
- Schneider P, Caspersen MB, Mondorf K, Halkier T, Skov LK, Ostergaard PR. 1999. Characterization of a *Coprinus cinereus* lacase. *Enzyme Microbial Technology* 25: 502–528.
- Schoch C, Shoemaker RA, Seifert KA, Hambleton S, Spatafora JW, Crous PW. 2006. A multigene phylogeny of the *Dothideomycetes* using four nuclear loci. *Mycologia* 98: 1041–1052.
- Scott R. 2006. Principles and Practice of Chromatography. Chrom-Ed Series. 756pp.
- Sedó S, Iribarne Y, Fossas M, Vendrell C, Ortiz F. 2003. Queratitis fúngica. *Annals d'Oftalmologia* 11(3): 168-175.
- Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. 2001. Production, purification, characterization and applications of lipase. *Biotechnol Adv.*19: 627-662.
- Sheehan D. 2003. Fast Protein Liquid Chromatography 244, pp.
- Shieh CJ, Liao HF, Lee CC. 2003. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. *Bioresource Technology* 88: 103–106.
- Shleev SV, Morozova OV, Nikitina OV, Gorshina ES, Rusinova TV, Serezhenkov VA, Burbaev DS, Gazaryan I, Yaropolov A. 2004. Comparison of physical-chemical characteristics of four laccases from different basidiomycetes. *Biochimie* 86: 693-703.
- Slippers B, Wingfield MJ. 2007. Review: *Botryosphaeriaceae* as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. *Fungal biology reviews* 21:90-106.

Smith PK, *et al.*. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 159: 76-85.

Skoog D, Holler F, Crouch S.; 2007; Principles of Instrumental Analysis. 6th Edition Casebound. 832pp.

Subramanyan S, Sandia GS, Prema P. 2001. Controlo of xylanase production without protease activity in *Bacillus sp.* by selection of nitrogen source. *Biotechnology letters* 23: 369-371.

Summerbell RC, Krajden S, Levine R, Fuksa M. 2004. Subcutaneous phaeohyphomycosis caused by *Lasiodiplodia theobromae* and successfully treated surgically. *Medical Mycology* 42(6):543-547.

Tunga R, Shrivastava B, Banerjee R. 2003. Purification and characterization of a protease from solid state cultures of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry* 38: 1553–1558.

Uenojo M, Pastore GM. 2007. Pectinases: Aplicações industriais e perspectivas. *Quim. Nova* 30:388-394.

Úrbez-Torres JR, Leavitt GM, Voegel TM, Gubler WD. 2006. Identification and distribution of *Botryosphaeria spp.* associated with grapevine cankers in California. *Plant Dis.* 90:1490-1503.

Van Der Maarel MJEC, *et al.* 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *Journal of Biotechnology* 94:137-155.

Vasconcelos AFD, Barbosa AM, Dekker RFH, Scarminio IS, Rezende MI. 2000. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria sp.* in the presence of veratryl alcohol by response-surface method. *Process Biochemistry* 35: 1131-1138.

Watanabe N, Ota Y, Minoda Y, Yamada K. 1977. Isolation and identification of alkaline lipase producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agricul. Biol. Chem.* 41: 1353-1358.

Wiechelman K, Braun R, Fitzpatrick J. 1988. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem.* 175: 138-142.

Wong KKY, Saddler JN. 1992. *Trichoderma* xylanases, their properties and applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12: 413-435.

Wood TM. 1992. Fungal cellulases. *Biochem. Soc. Transact.* 20:46-52.

Yaver DS, Xu F, Golightly EJ, Brown KM, Brown SH, Rey MW, Schneider P, Halkier T, Mondorf K, Dalboge H. 1996. Purification, Characterization, Molecular Cloning, and Expression of Two Laccase Genes from the White Rot Basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 62 (3): 834-841.

Zhou J, Wang Y, Chu J, Zhuang Y, Zhang S, Yin P. 2008. Identification and purification of the main components of cellulases from a mutant strain of *Trichoderma viride* T 100-14. *Bioresource Technology* 99: 6826–6833.

Zhu X, Gibbons J, Garcia-Rivera J, Casadevall A, Williamson PR. 2001. Laccase of *Cryptococcus neoformans* is a cell wall-associated virulence factor. *Infect. Immun.* 69:5589-5596.

*Anexos*

**Anexo 1:** Tabela referente à quantificação de proteínas dos isolados utilizando o BSA Protein Assay Kit

Estirpe	Concentração ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	Volume a carregar no gel de Zimografia ( $\mu\text{L}$ )
1	456,5	12,0
2	444,6	12,4
3	1161,9	4,7
4	334,5	16,4
5	364,3	15,1
6	360,0	15,3
7	460,0	11,7
8	565,2	9,7
9	4800,0	1,1
10	1173,7	4,7
11	10201,5	0,5
12	984,3	5,6
13	378,3	14,5
14	1676,3	3,3
15	280,1	19,6
16	334,5	16,4
17	280,1	19,6
18	360,0	15,3
19	334,5	16,4
20	148,4	37,1
21	278,0	19,8
22	421,5	13,0
23	812,7	6,8
24	398,4	13,8
25	357,4	15,4
26	280,1	19,6
27	4095,5	1,3
28	470,5	11,7
29	628,3	8,8
30	744,3	7,39
31	211,6	25,99
32	1217,6	4,52
33	1202,7	4,57
34	1047,9	5,25
35	357,4	15,4
36	348,5	15,78
37	294,9	18,65
38	815,8	6,74
39	461,0	11,9
40	2305,6	2,4
41	542,1	10,1
42	3055,6	1,8
43	5886,7	0,9
44	303,4	18,13
45	5990,3	0,92

46	702,0	7,83
47	551,1	9,98
48	659,2	8,34
49	839,4	6,55
50	278,6	19,74
51	15073,6	0,36
52	5607,4	0,98
53	348,5	15,78